

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen**

Aus der Klinik für Kinderheilkunde III
Pädiatrische Hämatologie, Onkologie,
Pulmologie und Kardiologie

Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

**Etablierung eines Modells zur Darstellung des Proteoms
nach neuropathischer Schmerzstimulation in Spinalganglien
des Nervus ischiadicus der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrads der Medizin
durch die medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Martin Wilhelm Knorr
aus Mülheim an der Ruhr
2010

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting
1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. A. Eggert
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Z. Katsarava

Tag der mündlichen Prüfung: 10. August 2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Nozizeption und Schmerzphysiologie	6
1.2. Schmerzpathologie	8
1.3 Schmerzpharmakologie	9
1.3.1 Analgetika	9
1.3.2 Modelle zum neuropathischen Schmerz	11
1.4. Proteomanalyse („Proteomik“)	13
1.4.1. 2D – Gelelektrophorese (2D PAGE)	15
1.4.2 Färbemethoden	15
1.4.3. Proteindetektion	17
2. Zielsetzung	18
3. Material und Methoden	20
3.1. Chemikalien	20
3.2. Geräte	21
3.3. Tiere und Tierhaltung	22
3.4. Operation nach dem Tibial Nerve Injury (TNI) – Modell	22
3.4.1. Durchführung	22
3.5. Verhaltensstudien	23
3.5.1. Thermische Hyperalgesie (Plantar - Test)	23
3.5.2. Mechanische Allodynie (Von-Frey -Test)	24
3.5.3 Auswertung	24
3.6. Probenverarbeitung	24
3.6.1. Probenentnahme	24
3.6.2. Probenaufbereitung	24
3.6.3 Proteinbestimmungen	26
3.7. Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D PAGE)	26
3.7.1. Erste Dimension	27
3.7.2. Lösungen	27
3.7.3. Gelrehydrierung	29
3.7.4. Probenauftragung	29
3.7.5. Isoelektrische Fokussierung	29
3.7.6. Zweite Dimension / Grundlagen	30

3.7.7. Geläquilibrierung	30
3.7.8. Vorbereitung der SDS-Gele und der Gelstreifen	31
3.7.9. SDS - PAGE.....	31
3.8. Gelfärbung	33
3.8.1. Coomassie - Färbung / Grundlagen und Materialien	33
3.8.2. Coomassie - Färbung / Durchführung	34
3.8.3. Silberfärbung / Grundlagen	34
3.8.4. Silberfärbung / Durchführung:	35
3.8.5. Gellagerung.....	36
3.9. Gelauswertung.....	36
3.9.1. Eichung der IEF-Gele.....	36
4. Ergebnisse	38
4.1. Thermische Hyperalgesie (Plantartest).....	38
4.2. Mechanische Allodynie (von Frey-Test).....	39
4.3. Erstellung eines geeigneten Protokolls zur Darstellung des Proteoms ..	40
4.3.1. Probenaufbereitung	40
4.3.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese (SDS – PAGE).....	43
4.3.3. Wahl der Länge des IEF-Gelstreifens	43
4.3.4. Wahl des pH-/pI- Bereichs der IEF-Gelstreifen	43
4.3.5. Färbung der SDS - Gele.....	44
4.4. Vergleich der SDS - Gele.....	46
4.4.1. Vergleich der zweidimensionalen Gele bei TNI-operierten und Sham-operierten Tieren, ipsilaterale spinale Ganglien L4	47
4.4.2. Vergleich der zweidimensionalen Gele bei TNI-operierten Tieren an den ipsilateralen und kontralateralen spinalen Ganglien L6.....	47
5. Diskussion	51
5.1. Die Bedeutung der Proteomik in der Schmerzpharmakologie und bei der Behandlung von neuropathischem Schmerz	51
5.2. Tierexperimentelle Verhaltensstudien.....	53
5.3. Molekularbiologische Untersuchungen	56
5.4. Ausblick	61
6. Zusammenfassung.....	63
7. Literaturverzeichnis	64

8. Anhang	79
<i>8.1. Abkürzungen.....</i>	<i>79</i>
9. Danksagung	81
10. Lebenslauf	82

1. Einleitung

Eine der wichtigsten Sinneswahrnehmungen des Menschen ist die Schmerzempfindung. Die „International Association for the Study of Pain“ definiert Schmerz als ein *„unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder drohender Gewebeschädigung einhergeht oder von betroffenen Personen so beschrieben wird, als wäre eine solche Gewebeschädigung die Ursache.“* (Merskey, Bogduk, 1994).

Die Bedeutung des Schmerzes wird klar, wenn man sich anschaut was geschieht, wenn man keine Schmerzen fühlen kann. Der Schmerz ist für das Überleben der Menschen unerlässlich. Fehlt die Schmerzwahrnehmung komplett, ist die betroffene Person nicht fähig, eine drohende Verletzung oder Schädigung des Körpers vorherzusehen. Alle anderen Sinne und Reflexe sind jedoch vorhanden. Dies ist zum Beispiel bei der sehr seltenen, autosomal-rezessiv vererbten „kongenitalen Analgesie“ der Fall. In einer Arbeit von Cox et al. wird von einem Jungen aus Pakistan berichtet, der an dieser seltenen Krankheit litt. Er zeigte schon als Säugling keinerlei Schmerzreaktion und machte im Alter von 10 Jahren Theatervorführungen auf der Straße, wo er sich Messer durch den Arm stach und über glühende Kohlen lief. Er starb vor seinem 14. Geburtstag, als er von einem Haus sprang. Da die gesamte Familie von dieser Krankheit betroffen war, konnte die Arbeitsgruppe von Cox et al. einen Funktionsverlust der α -Untereinheit eines durch das SCN9A-Gen kodierten Natriumkanals verantwortlich machen. Dieses Protein kommt besonders häufig in nozizeptiven Neuronen vor und könnte ein Ziel von neuen analgetischen Therapien sein (Cox et al., 2006).

1.1. Nozizeption und Schmerzphysiologie

Die Schmerzwahrnehmung ist ein separates Sinnessystem, welches den Körper über schädigende Einflüsse informiert. Man unterscheidet zwischen somatischen Schmerzen als Oberflächenschmerz (z.B. Haut) und

Tiefenschmerz (z.B. Muskulatur, Knochen) sowie dem viszerale Schmerz der inneren Organe (z.B. bei Angina pectoris). Es gibt mechanosensible, hitzeempfindliche, chemosensible und polymodale Nozizeptoren, die als Nervenendigungen des sensiblen Nervensystems die Schmerzinformation weitergeben. Ein schädlicher Stimulus wird am peripheren Ende von Schmerz-Rezeptoren, sogenannten Nozizeptoren, von unmyelinisierten C-Fasern oder von schwach myelinisierten A δ -Fasern über das Rückenmark an den Cortex übertragen. Zahlreiche Mediatorstoffe wirken zudem auf die nozizeptiven Neuronen. Beispielsweise werden Prostaglandine und Leukotriene aus geschädigten Zellen bei Entzündungen freigesetzt, Histamin wird von den Mastzellen ausgeschüttet oder die Nozizeptoren selbst können bei Schädigung Substanz P produzieren. Diese Mediatoren können die nozizeptiven Neuronen aktivieren oder sensibilisieren. Die peripheren Nervenfasern leiten die nozizeptiven Informationen dann über die Hinterwurzel in das Rückenmark weiter. Die Hinterwurzeln innervieren abgegrenzte Bereiche der Haut, die Dermatome genannt werden. Über den Hinterstrang wird die Information über die Thalamuskern zur Großhirnrinde geleitet. Zahlreiche Kollateralen haben jedoch über Interneurone Einfluss auf das motorische und vegetative Nervensystem (Brain, Moore, 1999).

Es ist immer noch sehr wenig darüber bekannt, wie der Schmerz als unangenehme Empfindung zentral wahrgenommen wird. Sicher ist, dass die Schmerzwahrnehmung ein außerordentlich komplexes System ist und gelegentlich auch falsche Informationen weitergibt. So gibt es Schmerzarten, bei denen die Schmerzafferenzen in einem anderen als dem wahrgenommenen Gebiet liegen (sogenannter „projizierter Schmerz“, bei viszerale Afferenzen die peripher gespürt werden auch „übertragener Schmerz“). Beim „Phantommerz“, der nach Amputation auftritt, spürt man einen Schmerz, der in die fehlende Extremität projiziert wird (Deetjen et al., 2006 und Brain, Moore, 1999).

1.2. Schmerzpathologie

Nach wie vor ist die Klassifikation der Schmerzarten in der internationalen Literatur recht uneinheitlich. Man kann zwischen akutem und chronischem Schmerz unterscheiden. Ein akuter Schmerz ist insofern physiologisch, weil er den Körper vor Schädigung warnt und nach Ausheilung sistiert. Der chronische Schmerz hingegen persistiert auch nach Ausheilung einer Läsion oder hat gar keine Gewebeschädigung zur Ursache. Er muss definitionsgemäß mindestens drei bis sechs Monate anhalten. Chronischer Schmerz hat im Gegensatz zum akuten Schmerz einen eigenständigen Krankheitswert (Wang, Wang, 2003).

Schmerzformen können auch ätiologisch unterteilt werden: die aktuelle Ausgabe des „Pschyrembel – klinisches Wörterbuch“ unterscheidet den Nozizeptorenschmerz, der Folge einer Reizung von Schmerzrezeptoren ist, vom funktionellen Schmerz (z.B. bei Migräne durch vaskuläre Fehlregulation) und vom neuropathischen Schmerz (Pschyrembel, 2007).

Der neuropathische Schmerz wird von der „International Association for the Study of Pain“ definiert als *Schmerz der durch eine Läsion oder Dysfunktion des Nervensystem ausgelöst oder verursacht wird* (Chen et al., 2004). Neuropathischer Schmerz kann sehr unangenehm und langwierig sein. Er wird zunächst durch verschiedene Schädigungen an zentralen oder peripheren Nerven ausgelöst, bleibt aber auch noch lange Zeit nach der Schädigung erhalten. Die Symptomatik des neuropathischen Schmerzes umfasst den spontanen Schmerz, die Hyperalgesie (vermehrte Schmerzantwort auf einen Schmerzreiz) und die Allodynie (Schmerzempfindung auf einen Reiz, der normalerweise keine Schmerzen auslöst). Ursachen des neuropathischen Schmerzes sind Infektionen (z.B. Herpes Zoster), Stoffwechselerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus), Traumata und neurotoxische Stoffe sein (Woolf, Mannion, 1999).

Die Ätiologie von neuropathischen Schmerzen ist noch nicht vollständig geklärt (Niederberger, Geisslinger, 2008). Eine mögliche Theorie geht davon aus, dass die Entstehung von neuropathischen Schmerzen multifaktoriell ist und ein

Disäquilibrium der peripheren und zentralen Nervenzellen darstellt (Woolf, Mannion, 1999). Das Entstehen einer Allodynie oder Hyperalgesie nach peripherer Nervschädigung wird sowohl von *Scholz und Woolf* (Scholz, Woolf, 2002) als auch von *Swamydas* (Swamydas et al., 2004) auf sogenanntes „Sprouting“ zurückgeführt. Hierbei stellen nach Nervenschädigung nicht-nozizeptive myelinisierte A β -Fasern in der Hinterwurzel des Rückenmarks eine Verbindung zu nozizeptiven Fasern her. Diese A β -Fasern haben ein deutlich niedrigeres Schwellenpotential als normale nozizeptive Fasern und reagieren folglich sensibler. Zudem wird die Produktion von inhibitorischen Neurotransmittern reduziert, was ebenfalls zur Folge hat, dass die Reizschwelle von nozizeptiven Neuronen herabgesetzt wird, so dass diese auf nicht schädliche Reize reagieren. Einen weiteren Faktor könnten zwei Natriumkanäle darstellen, die möglicherweise nach Nervenschädigung vermehrt gebildet werden und so zu einer Hyperexzitabilität am Nerven führen. (Cavenagh et al., 2006) Ebenfalls scheinen Zellen der Mikroglia eine entscheidende pathophysiologische Rolle im zentralen Nervensystem zu spielen. (Ji, Suter, 2007) Es gibt noch zahlreiche weitere Theorien zum Mechanismus des neuropathischen Schmerzes, worüber die kürzlich erschienene Übersichtarbeit von *Campbell und Meyer* berichtet (Campbell, Meyer, 2006).

Auch bei Kindern spielt neuropathischer Schmerz eine Rolle, obwohl natürlich viele der oben genannten Erkrankungen nur sehr selten vorkommen. Phantomschmerzen nach Amputationen (nach Tumorerkrankungen, Meningokokkensepsis oder Traumata), Narbenneurome nach chirurgischen Eingriffen oder das komplexe regionale Schmerzsyndrom bei Teenagern sind wichtige Beispiele (Ingelmo, Fumagalli, 2004 und Roth-Isigkeit, 2006).

1.3 Schmerzpharmakologie

1.3.1 Analgetika

Die Schmerzpharmakologie hat einige wichtige Medikamente zur Therapie von Schmerzen entwickelt. Eines der ersten und auch heute bedeutendsten ist die

1897 erstmalig entwickelte Acetylsalicylsäure. Schon lange zuvor war bekannt, dass die Rinde von Weidenbäumen gegen Schmerzen wirksam ist. Doch auch nachdem der Wirkstoff Salizylsäure synthetisch hergestellt wurde, setzte sich das Medikament wegen des bitteren Geschmacks und der häufig auftretenden Magenbeschwerden nicht durch. Erst durch die Acetylierung wurde das Medikament verträglich (Dreser, 1899 und Weissmann, 1991). 1971 wurde erstmals von Vane entdeckt, dass die Acetylsalicylsäure ein Hemmer der Prostaglandinsynthese ist (Vane, 1971). Prostaglandine sind Proteine, die als Gewebshormone neben Entzündungsreaktionen und Gerinnung auch eine wichtige Rolle in der Nozizeption spielen.

Es gibt zahlreiche weitere Analgetika, die alle insbesondere zur Therapie des akuten Schmerzes entwickelt wurden. Peripher wirksam sind die sogenannten „nichtsteroidalen Antiphlogistika“, zu denen auch die Acetylsalicylsäure gehört. Alle Substanzen dieser Klasse wirken letztendlich durch Hemmung der Cyclooxygenase und verhindern die Bildung von Prostaglandinen. Diese Analgetika haben eine schwache bis mittelstarke Wirkung. Eine zentral analgetische Wirkung haben die Opioide, wie z.B. das Morphin, die an den Opioid – Rezeptoren ihre Wirkung entfalten. Die Opioide haben neben einer starken analgetischen Wirksamkeit auch zahlreiche Nebenwirkungen, wie z.B. das Abhängigkeitssyndrom. In der Lokaltherapie sind zahlreiche Analgetika bekannt, deren Funktion auf einer Hemmung der Natrium-Kanäle beruht, wie zum Beispiel das in der Regionalanästhesie häufig eingesetzte Lidocain (Weissmann, 1991). Vorteil der lokalen Analgetika sind eine relativ gute Wirkung am Applikationsort und geringe Nebenwirkungen. Neuropathische Schmerzen lassen sich allerdings schlecht mit diesen Wirkstoffklassen behandeln (Baron, 2006 und Wang, Wang, 2003).

Zusätzlich werden beim neuropathischen Schmerz relativ häufig Antiepileptika (wie z.B. Gabapentin) und Antidepressiva (wie z.B. Duloxetin) eingesetzt. Die Wirksamkeit dieser Medikamente konnte bei verschiedenen Formen des neuropathischen Schmerzes belegt werden, jedoch müssen auch hier zahlreiche Nebenwirkungen beachtet werden (Baron, 2006).

1.3.2 Modelle zum neuropathischen Schmerz

Zahlreiche Tiermodelle wurden zur Untersuchung von Schmerzen entwickelt. Einige Modelle arbeiten mit Primaten oder Säugetieren, die meisten Tiermodelle wurden jedoch mit Nagetieren etabliert. Mittlerweile gibt es auch erste zellbiologische Studien. Nachfolgend werden einige Verhaltensmodelle zum neuropathischen Schmerz vorgestellt. Man kann zunächst zwischen Modellen mit zentraler und peripherer Schädigung unterscheiden. Zentrale Schmerzen werden meist durch Schädigung im Bereich des Rückenmarks (Spinal Cord Injury) simuliert, die periphere Schädigung wird in den meisten Modellen durch mechanische, thermische oder chemische Einwirkung hervorgerufen (Wang, Wang 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell zur Schädigung eines peripheren Nervens genutzt. Es existieren bereits verschiedene Tierstudien, die periphere neuropathische Schmerzen beim Menschen simulieren. Die meisten Modelle arbeiten mit einer Läsion im Bereich des Nervus ischiadicus der Ratte und unterscheiden sich insbesondere in Ort und Art der Läsion (Wang, Wang, 2003). Dabei wird eine lockere (Bennett, Xie, 1988) oder straffe Ligation (Kim, Chung, 1992) durchgeführt, ein Teil des Nervus ischiadicus ligiert (Seltzer et al., 1990), der Nervus ischiadicus an zwei peripheren Ästen durchtrennt (N. tibialis und N. peronealis communis, sog. „Spinal Nerve Injury“) (Decosterd, Woolf, 2000) oder auch am N. tibialis und N. suralis (Lee et al., 2000). Die wichtigsten Modelle sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt. In dem in dieser Arbeit gewählten Modell wurde nur ein peripherer Teil des Nervus ischiadicus, nämlich der Nervus tibialis durchtrennt (Tibial Nerve Injury) (Hofmann et al., 2000). Dieses sogenannte „Tibial Nerve Injury“ – Model wurde in dieser Arbeit genutzt, da es gegenüber anderen Modellen einige Vorteile bietet. Die operative Durchführung ist einfach, da nur ein einziger Nerv durchtrennt werden muss. Es wird kein Fremdmaterial in das Versuchstier eingebracht und bei der Versuchsdurchführung besteht eine hohe Erfolgsrate.

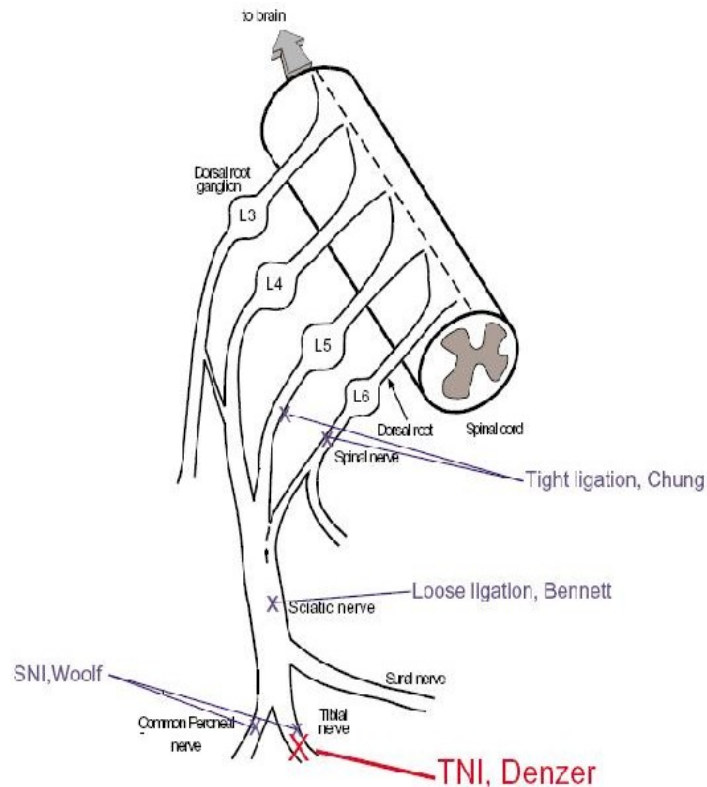


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Äste des Nervus ischiadicus bei der Ratte. Bei dem „Tibial Nerve Injury“ Modell (TNI) wird eine Transsektion des Nervus tibialis distal der Trifurkation des Nervus ischiadicus durchgeführt (Hofmann et al., 2000). Zusätzlich sind drei weitere neuropathische Schmerzmodelle dargestellt: Die „Tight Ligation“ nach *Kim und Chung* (Kim, Chung, 1992), die „Loose Ligation“ nach *Bennett und Xie* (Bennett, Xie, 1988) und das „Spinal Nerve Injury“ (SNI) - Modell nach *Decosterd und Woolf* (Decosterd, Woolf, 2000). (Modifikation nach Decosterd, Woolf, 2000)

Zur quantitativen Erfassung der neuropathischen Schmerzsymptome Hyperalgesie und Allodynie gibt es zwei standardisierte und regelmäßig in der Schmerzpharmakologie durchgeführte Testverfahren (Starowicz et al., 2002). Zur Quantifizierung von mechanischer Allodynie wird bei dem „von Frey Fasertest“ mittels eines borstenartigen Messfühlers der Druck gemessen, den ein Versuchstier maximal toleriert. Dieser Test wurde zum Beispiel von *Seltzer et al.* (Seltzer et al., 1990) und *Chaplan et al.* beschrieben (Chaplan et al., 1994). Erstmals von *Hargreaves et al.* wurde der Plantartest veröffentlicht, bei dem ein Infrarotstrahl auf eine Rattenpfote einwirkt und eine thermische Hyperalgesie ausgelöst wird (Hargreaves et al., 1988). Der ausführliche Versuchsaufbau wird im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben.

1.4. Proteomanalyse („Proteomik“)

Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen ist die experimentelle pharmakologische Forschung auf innovative wissenschaftliche Methoden angewiesen. Im Bereich der Schmerzpharmakologie wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die auf der Ebene der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Ribonukleinsäure (RNS) Veränderungen in chronischen Schmerzmodellen gezeigt haben (Mattick, 2003). Die meisten pharmakologischen Substanzen wirken jedoch an Proteinen, so dass Untersuchungen auf Proteinebene prinzipiell geeignet erscheinen, Zielstrukturen und neue Wirkstoffe zu identifizieren. „Proteomik“ oder auch die Proteom - Forschung ist ein relativ neues Gebiet der Biochemie, welches Mitte der neunziger Jahre erstmals beschrieben wurde (Kahn, 1995). Nachdem das vollständige menschliche Genom entschlüsselt wurde, zeigten die durchgeführten Studien, dass das Genom nur einen relativ statischen Überblick über das funktionelle Potential eines Organismus ermöglicht. Es beschreibt nicht die dynamischen Prozesse, die in jedem lebenden Organismus stattfinden. Die phänotypische Umsetzung dieser genetischen Information, d.h. die Translation der verschiedenen Gene in Proteine, läuft aber in den verschiedenen Entwicklungsstadien eines Organismus sowie in verschiedenen Zelltypen und unter verschiedenen Umweltbedingungen unterschiedlich ab (Wilkins et al., 2006 und Mattick, 2003).

Im Gegensatz zur Genomanalyse liefert die RNS-Expression bereits ein wesentlich realistischeres Bild der tatsächlichen Vorgänge in einer Zelle. Die Ergebnisse von Genexpressionsanalysen auf Transkriptionsebene spiegeln aber die Proteinexpression in einer Zelle nicht gänzlich wieder. Gene können vorhanden sein, sie können mutiert sein, aber sie sind nicht unbedingt transkribiert, und einige mRNS sind transkribiert, aber nicht translatiert. Dadurch, dass ein Gen für mehrere verschiedene Proteine kodieren kann, z.B. durch alternatives Spleißen des mRNS-Transkripts, stellt eine Analyse auf Proteinebene ein im Vergleich zur Genomanalyse noch komplexeres Problem dar. Zudem können posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Acetylierungen, Methylierungen oder kontrollierte Proteolyse

die funktionellen Abläufe in einer Zelle bestimmen. Zusätzlich spielt die räumliche Verteilung der Proteine in der Zelle und deren dynamische Translokation zwischen verschiedenen zellulären Kompartimenten eine wichtige Rolle. Ebenso ist die Reaktion der Proteine auf veränderte Bedingungen in ihrer Mikroumgebung (z.B. ihre Zerlegung in einzelne Untereinheiten oder kleinere Peptide, oder ihr geändertes Bindungsverhalten für andere Proteine und Moleküle) von Wichtigkeit. Darüber hinaus kann ein einzelnes Protein an verschiedenen Prozessen beteiligt sein. Andererseits können wieder ähnliche Funktionen von unterschiedlichen Proteinen ausgeführt werden. Da die Menge an mRNA nur schlecht mit der Menge an kodiertem Protein korreliert, lassen sich die biologischen Prozesse und Systeme erst durch die Charakterisierung der Proteine beschreiben (Gygi et al., 1999).

Der Begriff „Proteom“ wurde 1994 von *Marc Wilkins* eingeführt. Unter einem Proteom versteht man die quantitative Gesamtheit aller exprimierten Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt. Das Fachgebiet „Proteomik“ kann in zwei Hauptbereiche geteilt werden. Die *Expressionsproteomik* beschäftigt sich mit der quantitativen Erfassung globaler Veränderungen des Expressionsmusters der Proteine in einem gegebenen Gewebe, Organ, Serum oder Körperflüssigkeit (Jungblut et al., 1999). Die *Funktionsproteomik* schließt die systematische Analyse von Protein-Protein oder Protein-DNS/RNS Wechselwirkungen und posttranslationale Modifikationen ein, die erklären sollen, wie die lebenden Zellen auf innere und äußere Signale reagieren, und so unser Verständnis für die in den Zellen ablaufenden biologischen Prozesse erhöht (von Mering et al., 2002). Eine möglichst genaue Definition des zu untersuchenden Zustands vor der Proteomanalyse ist sehr wichtig, da der nichtstatische Charakter eines Proteoms von verschiedenen Parametern, wie Zellstress, Alter, Temperatur und diversen anderen Wechselwirkungen beeinflusst wird.

1.4.1. 2D – Gelelektrophorese (2D PAGE)

Die zweidimensionale Elektrophorese ist eine weitverbreitete Methode zur Analyse von komplexen Proteinmischungen aus Zellen oder Geweben. Zuerst beschrieben sie - unabhängig voneinander - *P.H. O'Farrell* und *J. Klose* (O'Farrell, 1975 und Klose, 1975). Immobilisierte pH-Gradienten und Fertig-Gele mit Plastikbeschichtung, wie sie von Görg vorgestellt wurden, verfeinerten die Technik (Görg et al, 1985 und Görg et al., 1988). Mit dieser Technik ist man prinzipiell in der Lage, komplexe Mischungen von bis zu 10.000 Proteinen in einem Gel zu trennen (Klose, Kobalz, 1995). Die 2D-PAGE ist die Kombination zweier unabhängiger Trennschritte. Der erste Trennschritt, die isoelektrische Fokussierung, macht sich die Ladungseigenschaften der Proteine zunutze. Der Ladungszustand von Polypeptiden ist von ihren jeweiligen Mustern geladener Aminosäuren und vom pH-Wert abhängig und somit individuell charakteristisch. Ein Protein wandert in einem elektrischen Feld entlang eines pH-Gradienten bis zu seinem isoelektrischen Punkt. An diesem pH-Punkt reichert sich das Protein an und wird fokussiert. Im zweiten Trennschritt, der SDS-PAGE, werden die an ihrem isoelektrischen Punkt fokussierten Proteine mit SDS beladen und wandern als negative SDS-Protein-Komplexe in einem elektrischen Feld durch ein Polyacrylamidgel. SDS ist ein negativ geladenes, stark denaturierendes Detergens, welches alle nichtkovalenten Bindungen, die die Proteinstruktur bestimmen, aufhebt. Die Wanderungseigenschaft der Proteine wird bei der SDS-PAGE dementsprechend durch das Molekulargewicht bestimmt. Ein typisches 2D-Gel umfasst einen pH-Bereich von 3–10 und einen Molekulargewichtsbereich von 5–150 Kilodalton (KDa). Nach der Auftrennung des Proteoms müssen die Proteine für die Auswertung detektiert werden (Görg et al., 2004).

1.4.2 Färbemethoden

Für die Visualisierung der aufgetrennten Proteine existieren verschiedene Detektionsmethoden. Bei der Wahl der Färbemethode müssen verschiedene

wichtige Parameter berücksichtigt werden: maximale Nachweisgrenze, linearer Messbereich und Kompatibilität der Färbemethode mit der Massenspektrometrie (Tabelle 1). In dieser Arbeit wurden Coomassie und Silbernitrat-Färbungen verwendet. Die Coomassie-Färbung ist die erste Färbung, die in der 2D-Gelelektrophorese angewandt wurde (O'Farrell, 1975). Dafür wird Coomassie Brilliant Blue benutzt, ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert. Diese Färbung ist vor allem einfach durchzuführen und hat eine ausreichende Nachweisgrenze zumindest für abundante Proteine. Coomassie – Färbung ist darüber hinaus gut kompatibel mit der Massenspektroskopie.

Die Silberfärbung wurde in den 80er Jahren erstmalig für die 2D-PAGE verwendet. Dabei wird zunächst das gesamte Gel mit Silberionen gesättigt, welche sich an die Proteine binden.

Tabelle 1 Wichtige Färbemethoden für die Detektion von Proteinen in der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Miller, 2006).

Färbemethode	Nachweis-grenze	Linearer Messbereich	Bemerkung	Referenz
Coomassie	8-10 ng	1 Größenordnungen	MS-kompatibel	(Neuhoff et al., 1985)
Silber	1 ng 3-5 ng	1-2 Größenordnungen	MS-inkompatibel MS-kompatibel	(Heukeshofen, Dernik, 1985 und Nesterenko et al., 1994)
SyproRuby	1 ng	3 Größenordnungen	MS-kompatibel	(Yan et al., 2000)
DIGE-minimal	0.1-0.2 ng	3-5 Größenordnungen	Multiplexing	(Tonge et al., 2001)
DIGE-gesättigt	0.005-0.010 ng	3-5 Größenordnungen	Multiplexing	(Shaw et al., 2003)

Nachdem die übriggebliebenen Silberionen aus dem Gel gewaschen wurden, werden die an die Proteine gebundenen Ionen zu metallischem Silber reduziert. Viele verschiedene Protokolle von Silberfärbungen wurden entwickelt, die entweder auf saurer oder alkalischer Basis arbeiten. In dieser Arbeit wird eine standardisierte alkalische Färbung verwendet. Vorteil der Silberfärbung ist eine deutlich höhere Nachweisgrenze im Vergleich zur Coomassie - Färbung, jedoch ist sie nicht gut für quantitative Aussagen nutzbar (Miller et al., 2006). Die ursprüngliche Form der Silberfärbung war nicht für die Massenspektroskopie geeignet. In den neunziger Jahren wurden jedoch Protokolle entwickelt, die dieses möglich machen (Nesterenko et al., 1994).

Eine Weiterentwicklung der 2D-PAGE stellt die 2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (DIGE) dar. Bei dieser Technologie werden die Proteinproben vor der 2D-PAGE mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Es können bis zu drei markierte Proteinmischungen auf demselben 2D-Gel gleichzeitig getrennt und analysiert werden (Tonge et al., 2001 und Timms, Cramer 2008). Diese Technik stand für den experimentellen Teil dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung.

1.4.3. Proteindetektion

An Gelelektrophorese und Färbung schließt sich die Detektion der Proteine an. Die meist geringen Mengen stellen eine Herausforderung an die analytischen Verfahren dar. Heutzutage werden hauptsächlich massenspektrometrische Verfahren eingesetzt, die bei bekanntem Genom des untersuchten Organismus die Proteinidentifizierung anhand von proteolytischen Peptiden erlauben. Nach der chemischen oder enzymatischen Proteolyse der getrennten Proteine, die direkt im Gel durchgeführt werden kann, werden die erhaltenen Peptide eluiert und dem Massenspektrometer zugeführt. Der erhaltene, für ein Protein spezifische Peptidmassenfingerprint (PMF) kann über Proteindatenbanken mit theoretisch verdauten Proteinen identifiziert werden (Görg et al., 2004). Die Proteindetektion soll in weiteren Studien untersucht werden, daher wurde in dieser Arbeit zunächst eine visuelle Auswertung der Gele durchgeführt.

2. Zielsetzung

Neuropathische Schmerzen stellen nach wie vor eine Herausforderung und einen Bedarf für die Entwicklung neuer analgetischer Medikamente dar. Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen ist die experimentelle pharmakologische Forschung auf innovative wissenschaftliche Methoden angewiesen. In dieser Arbeit sollte die Methodik zur Analyse möglicherweise differentiell exprimierter Proteine in einem Tiermodell für neuropathische Schmerzen als Ausgangsbasis für die Identifizierung neuer Therapiezielmoleküle etabliert werden. Hierzu sollte ein zuvor in der Literatur beschriebenes schmerzpharmakologisches Rattenmodell, das „Tibial Nerve Injury“-Modell (TNI), genutzt werden. In diesem Modell sollte zunächst die Entwicklung neuropathischer Schmerzen simuliert werden, um in einer anschließenden Proteomanalyse Hinweise auf ein potentiell verändertes Proteinmuster in den betroffenen Hinterstrangganglien der Tiere zu finden.

Nach Etablierung des TNI-Modells im Labor sollte mit Hilfe von Verhaltensstudien zunächst eine thermische Hyperalgesie (Plantartest) sowie eine mechanische Allodynie (von Frey-Test) nach neuropathischer Nervschädigung bei den Tieren nachgewiesen werden. Anschließend galt es, die betroffenen Hinterstrangganglien der Ratten operativ zu entfernen und eine geeignete Methode zur Probenaufbereitung des Gewebes für eine nachfolgende zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese zu definieren. Mit der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese ist es möglich, einen großen Teil des Proteoms einer Zelle aufzutrennen und die einzelnen Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren. Für die erfolgreiche Durchführung der Methode sollten in dieser Arbeit die geeigneten Rahmenbedingungen getestet und definiert werden. Im einzelnen sollten dabei folgende Punkte beachtet werden:

- Optimale Proteinmenge zur Gelbeladung
- Optimal geeignete Gelfärbung
- Optimale Gelauswahl zur Analyse des erwarteten Proteinspektrums

- Geeignete Methoden zur Zuordnung der Proteingröße und des isoelektrischen Punktes

Als Endpunkt der Arbeit sollten geeignete 2D-Gele für die weitergehende massenspektrometrische Analyse differentiell exprimierter Proteinspots zur Verfügung stehen.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

BCA Protein Assay®	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Blue R 250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Detergens CHAPS	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Dithiotreitol DTT	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
DryStrip Cover Fluid	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
ExelGel® SDS Buffer Strips, Anode	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
ExelGel® SDS XL12-14	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Formaldehyd	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Full Range Rainbow Marker	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Glutardialdehyd (25% w/v)	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Glycerol 87 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff (PlusOne Urea®)	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Immobiline DryStrip® Gel 11 cm, pH 3-10	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Immobiline DryStrip® Gel 18 cm, pH 3-10	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Iodacetamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
IPG Puffer pH 3-10	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden

Kerosin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Methanol 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mineralöl (Plus One DryStrip Cover Fluid®)	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Natriumacetat	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Natriumdodecylsulfat SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumthiosulfatlösung (5% w/v)	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Pentobarbital (Nembutal ®)	Sanofi-Aventis, Libourne, Frankreich
Proteaseinhibitor (Complete ®)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Rattenfutter Typ 1324	Altromin, Lage, Deutschland
Silbernitratlösung (2,5% w/v)	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Stopplösung EDTA-Natrium	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Tris-Puffer (PlusOne Tris®)	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden

3.2. Geräte

Durchlauf-Wasserkühlgerät	Langheinz, Starzach, Deutschland
Electronic von Frey Anesthesiometer	IITC, Woodlands, California, USA
EPS 3501 Power Supply	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Ettan IPGphor Isoelectric Focusing Unit	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Ettan IPGphor Strip Holders	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden
Excel	Microsoft, Redmond, USA
JMP Software	SAS Institute, Cary, USA
Multiphor II Electrophoresis Unit	GE Life Sciences, Uppsala, Schweden

Photometer 550 SE	Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts,
Plantar Test (Hargreaves Method)	Ugo Basile, Comerio, Italien
Homogenisator nach Potter-Elvesjem	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden,
Zentrifuge 5414	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.3. Tiere und Tierhaltung

Männliche Wistar - Ratten wurden in Gruppen von 6 Tieren unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur war 22°C +/- 1°C und die Luftfeuchtigkeit 55 % +/- 5%, der Raum wurde zwischen 7 h und 19 h beleuchtet. Die Tiere wurden mit herkömmlichem Rattenfutter Typ 1324 und Leitungswasser ad libitum ernährt. Die experimentellen Protokolle waren konform mit den laborinternen Regelungen und den ethischen Richtlinien der "International Association for the Study of Pain" (Zimmermann, 1983).

3.4. Operation nach dem Tibial Nerve Injury (TNI) – Modell

3.4.1. Durchführung

Die Tiere wurden 3 Tage vor der Operation an die Laborbedingungen gewöhnt. Am Operationstag wurde sie randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei die eine Gruppe nur einen Hautschnitt ohne Neurotomie erhielt (Sham-Gruppe), die zweite Gruppe jedoch neurotomiert wurde (TNI-Gruppe). Die Ratten wurden dann mit Pentobarbital narkotisiert. Bei der Sham-Gruppe wurde der linke Nervus ischiadicus in Höhe der Trifurkation freipräpariert, bei der TNI-Gruppe wurde zusätzlich distal der Trifurkation des Nervus ischiadicus der Nervus-tibialis-Ast durchtrennt, die Nervi suralis und peroneus communis blieben aber unbeschadet. Nach der Operation wurden die Tiere in einem Käfig bei 37° C gehalten und bis zum Erwachen beobachtet.

3.5. Verhaltensstudien

Vor der Probenentnahme wurden bei den Versuchstieren Verhaltensstudien zur Wirksamkeit der TNI - Operation durchgeführt. Nach der Operation sollten die Tiere, bei denen der Nervus tibialis durchgetrennt wurde (TNI-Gruppe), eine thermische Hyperalgesie und eine mechanische Allodynie entwickeln. Hingegen sollten zeigen die Verhaltensstudien bei der Sham-Gruppe normale Werte.

Die thermische Hyperalgesie wurde mit dem Plantar -Test gemessen. Dieser Test wurde zuerst von *Hargreaves et al.* beschrieben (Hargreaves et al., 1988) und auf Reliabilität von *Montagne-Clavel et al.* untersucht (Montagne-Clavel et al., 1996). Eine mechanische Allodynie wurde bei den Tieren mit Hilfe des von Frey-Tests durchgeführt, wie er zum Beispiel von *Seltzer et al.* (Seltzer et al., 1990) und *Chaplan et al.* beschrieben wurde (Chaplan et al., 1994) und in zahlreichen schmerzpharmakologischen Studien für Verhaltenstests genutzt wird (Starowicz et al., 2002). Die Versuchstiere wurden in Käfigen mit einem Maschendrahtboden getestet.

3.5.1. Thermische Hyperalgesie (Plantar - Test)

Die Ratten wurden 5 Minuten vor Versuchsbeginn in einen Käfig mit Glasboden gesetzt, der Glasboden war von unten zugänglich. Nachdem die Tiere den Käfig erkundet hatten, blieben sie ruhig sitzen. Unter dem Glasboden wurde eine Hitzequelle mit Infrarotstrahlung an die zu untersuchende Hinterpfote geführt. Der Beginn der Hitzestimulierung (mit einer automatischen Ausschaltung nach 31.5 Sek.) wurde manuell ausgelöst, gleichzeitig wurde ein Zeitmesser aktiviert. Dieser Zeitmesser ist durch eine auf die Hinterpfote ausgerichtete Photozelle gesteuert. Sobald das Tier reflektorisch die Hinterpfote hebt oder leckt, wird durch die Photozelle die Zeitmessung beendet. Gemessene Reaktionszeiten waren kleiner als 0,1 Sekunden. Die Austrittsöffnung der Hitzequelle maß 5 x 10 mm. Sie wurde rechtwinklig und zentriert unter die zu untersuchende Hinterpfote positioniert.

3.5.2. Mechanische Allodynie (Von - Frey - Test)

Die Versuchstiere wurden mindestens fünf Minuten vor Versuchsbeginn in einen Käfig mit Drahtgitterboden gesetzt. Die Von-Frey-Fasern wurden unterhalb der zu untersuchenden Hinterpfote durch den Drahtboden geschoben und damit die Hinterpfote leicht angehoben. Sobald das Tier die Pfote wegzog und/oder leckte, zeigte das Messgerät den maximalen gegen die Hinterpfote gemessenen Druck in Gramm an. Dieser Wert wurde als individuelle Reizschwelle angesehen.

3.5.3 Auswertung

Die Messwerte wurden mit Hilfe der Tabellenkalkulation Excel erfasst und dann mit Hilfe der Statistiksoftware JMP ausgewertet. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Zweiprobe - t - Tests ausgewertet.

3.6. Probenverarbeitung

3.6.1. Probenentnahme

Die Proben wurden jeweils am 14. Versuchstag entnommen. Dafür wurden die Tiere erneut mit Pentobarbital narkotisiert und zunächst eine Probe des Nervus ischiadicus proximal der Neurotomie entnommen. Danach wurde die Wirbelsäule freipräpariert und die Spinalganglien (DRG, Dorsal Root Ganglia) von L4, L5 und L6 entnommen. Die Proben wurden sofort in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70 °C gelagert.

3.6.2. Probenaufbereitung

Drei tiefgefrorene Spinalganglien (DRG) wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit 1 ml Lysierlösung versetzt. Die Lysierlösung zerstört durch Osmose und Detergentien die Zellwände. Der zugesetzte Proteaseinhibitor Complete® (Boehringer Mannheim, Deutschland) sollte das

Homogenat vor Proteolyse schützen.

Lysierlösung:

Harnstoff	12 g	8 M
CHAPS	1 g	4 %(w/v)
Trispuffer	0,12 g	
Proteaseinhibitor	50 µl	
Aqua dest.	ad 25 ml	

Um eine vollständige Auflösung der Zelle zu erreichen, wurde das Gewebe noch 60 Sekunden in einem Protein-Homogenisator nach Potter-Elvehjem bearbeitet. Der Homogenisator wurde dabei in einem Eisbehälter gekühlt. Die lysierte Probe wurde 3 Minuten in einer Zentrifuge bei 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

3.6.3 Proteinbestimmungen

Bei der Elektrophorese sollte die Proteinlösung jeweils in der gleichen Konzentration aufgetragen werden. Dazu wurde der BCA Protein-Test genutzt. Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit Cu^{2+} in einer alkalischen Lösung einen Komplex bilden (Biuret - Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen dieses Komplexes werden zu Cu^{1+} -Ionen reduziert, die mit Bicinchinon-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die Absorption dieses Farbkomplexes wurde bei 562 nm gemessen und mit einer Standardreihe, hier mit bovinem Serumalbumin (bovine serum albumin, BSA-Test), verglichen (Smith et al., 1985)

Die Homogenate wurden dazu 1:10 verdünnt, 50 µl dieser Lösung mit 1000 µl BCA-Reagenz in ein Photometergefäß pipettiert und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde mit einem Photometer (Perkin Elmer 550 SE) die Extinktion bei 562 nm gemessen. Der Proteingehalt der zu bestimmenden Probe ergibt sich aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit der aus den Standardwerten ermittelten Eichgeraden.

3.7. Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D PAGE)

In zwei Schritten werden die Proteine in der zweidimensionalen Gelelektrophorese getrennt. In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, erfolgt die Trennung nach dem isoelektrischen Punkt (pI). In der zweiten Dimension der SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese (SDS - PAGE) werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht sortiert. In einem zweidimensionalen Elektrophoresegel stellt idealer Weise jeder Spot ein einzelnes Protein dar. Informationen über Molekulargewicht, isoelektrischen Punkt und Menge eines speziellen Proteins können so gewonnen werden.

3.7.1. Erste Dimension

Die erste Dimension der zweidimensionalen Elektrophorese trennt die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt auf. Es wurden plastikverstärkte Gele mit immobilisierten pH-Gradienten verwendet, wie sie von *Bjellqvist et al.* beschrieben wurden und im Handel erhältlich sind. Die Verwendung der isoelektrischen Fokussierung in der zweidimensionalen Elektrophorese wurde im wesentlichen von *Görg et al.* (Görg et al., 1985 und Görg et al., 1988) dargestellt.

3.7.2. Lösungen

Lagerungslösung zur Rehydrierung

Harnstoff	12 g	8 M
CHAPS	500 mg	2 % (w/v)
IPG Puffer ph 3-10	125 ml	0,5% (v/v)
Bromphenolblau	wenige Körner	
Aqua dest.	Auf 25 ml	

Rehydrierungslösung

Lagerungslösung	1 ml
DTT	2,8 mg
Proteaseinhibitor (1 Tabl. aufgelöst in 1 ml A. dest)	ad 50 ml

Lagerungslösung zur Äquilibration

Tris – HCl Lösung (pH = 8,8)	20 ml	50 mM
Harnstoff	72.07 g	6 M

Glycerol 87 %	69 ml	30 %(v/v)
SDS	4,0 g	2% (w/v)
Aqua dest.	Ad 200 ml	

Äquibrierlösung 1

DTT	50 mg
Bromphenolblau	wenige Körner
Lagerungslösung	ad 20 ml

Äquibrierlösung 2

Iodacetamid	0,9 g
Bromphenolblau	wenige Körner
Lagerungslösung	ad 20 ml

3.7.3. Gelrehydrierung

Die Immobiline DryStrip Gele (18 cm Länge, pH 3-10) wurden in den Keramikträgern (Strip Holders) im Ettan IPGphor Elektrophoresegerät bei 20 °C mindestens 12h lang mit 400 µl Rehydrierungslösung rehydriert. Damit das Elektrophoresegel nicht austrocknet, wurde es mit 1 ml Mineralöl (Cover Fluid) bedeckt.

3.7.4. Probenauftragung

Nach der Rehydrierung wurde die Probe aufgetragen. In die vier Probenauftragsbuchten in den Keramikträgern wurden jeweils 7,5 µl der Probe auf das Gel pipettiert, d.h. insgesamt 30 µl pro IEF-Gelstreifen.

3.7.5. Isoelektrische Fokussierung

Dann wurden die Gele im Keramikträger in das IPGphor Elektrophoresegerät gelegt. Die Fokussierung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt, wobei in drei Schritten die Spannung ansteigt, gleichzeitig nimmt die Stromstärke ab (siehe Tabelle2).

Die hier verwendeten 18 cm Gelstreifen wurden insgesamt 6h fokussiert, zunächst eine Stunde bei 500 V, dann eine Stunde bei 1000 V und vier Stunden bei 8000 V. Während der Elektrophorese wanderte zunächst das in der Rehydrierlösung enthaltene Bromphenolblau zur Anode, was einen funktionierenden Stromfluss anzeigte; allerdings waren die Proteine erst zum Ende des Protokolls vollständig fokussiert. Nach Beendigung der Fokussierung wurden die Gelstreifen entweder direkt weiter verarbeitet oder bei -70°C in verschließbaren Reagenzgefäßen gelagert.

Tabelle 2 Spannungsbedingungen der Isoelektrischen Fokussierung

	Spannung	Zeit	Vh
Schritt 1	500 V	1:00 h	500 Vh
Schritt 2	1000 V	1:00 h	1000 Vh
Schritt 3	8000 V	4:00 h	32000 Vh

3.7.6. Zweite Dimension / Grundlagen

Die SDS - Polyachrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode, bei der Polypeptide nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionisches Detergens und ein Reduktant (hier DTT) sorgen dafür, dass die elektrische Ladung der Polypeptide und Proteine praktisch keinen Einfluss mehr auf die Bewegung im Gel haben und sich die Moleküle entsprechend ihres Molekulargewichts im Gel fortbewegen. Laemmli (Laemmli, 1970) beschrieb zum ersten Mal die SDS-PAGE mit einem Tris-Glyzin Puffersystem.

3.7.7. Geläquilibration

Kurz vor dem Beginn der SDS - Gelelektrophorese mussten die Gelstreifen an die zweite Dimension angepasst werden. Im Wesentlichen werden die Gelstreifen mit Natrium-Dodecylsulfat (SDS) als Puffer gesättigt (Äquilibration 1). Dithiotreitol (DTT) wird als Reduktant in Äquilibration 1 eingesetzt, um den reduzierten Status der Proteine zu erhalten. Es wird dann in einem zweiten Schritt (Äquilibration 2) durch Iodacetamid ersetzt, da DTT in einem Flachbett-Elektrophoresesystem zu Artefakten führen kann. Die Gelstreifen wurden entweder aufgetaut oder aus den Keramikträgern der ersten

Dimension in ein verschraubbares Reagenzgefäß überführt. Dann wurden sie mit 10 ml von Äquilibratorlösung 1 versetzt und 10 min leicht geschüttelt. Danach wurden sie kurz mit destilliertem Wasser abgespült und mit 10 ml von Äquilibratorlösung 2 versetzt. Nach 10 min leichtem Schütteln wurden die Streifen aus der Lösung herausgenommen.

3.7.8. Vorbereitung der SDS-Gele und der Gelstreifen

Die Kühlplatte der Multiphor II - Flachbett - Elektrophorese -Einheit wurde auf 15 °C vorgekühlt und 3 ml Kerosin auf der Platte verteilt. Die Gele wurden aus der Verpackung genommen und so auf die Kühlplatte gelegt, dass das Kerosin einen dünnen Film zwischen Platte und Gel herstellte und das Gel somit gleichmäßig gekühlt wurde. Dann wurden die Kathoden- und Anodenpufferstreifen (ExcelGel Buffer Strips) auf die jeweilige Seite des Gels blasenfrei aufgetragen. Die äquilibrierten IEF - Gelstreifen aus der ersten Dimension werden je 3 min von beiden Seiten vertikal auf ein Filterpapier gelegt, um überstehende Flüssigkeit aufzusaugen und damit Artefakte zu vermeiden. Danach wurden die Gelstreifen ca. 1cm parallel zur Kathode blasenfrei auf das SDS - Gel gelegt. Kurze Filterpapierstreifen an den Enden der Gelstreifen fingen Kondenswasser auf, welches sich während der Elektrophorese bildete und ebenfalls zu Artefakten führen konnte. Neben den Gelstreifen wurde auf kleine Filterpapierstreifen jeweils 10 µl Rainbow Molecular Weight Marker gegeben, um das Molekulargewicht eines Gelspots bestimmen zu können. Dann wurde die Glasplatte mit den Kontaktdrähten für Anoden- und Kathodenstreifen aufgelegt. Die gesamte Elektrophorese-Einheit wurde verschlossen.

3.7.9. SDS - PAGE

Die SDS-Gelelektrophorese wurde in der Multiphor II – Elektrophorese-Einheit bei konstant 15°C in zwei Stufen durchgeführt (siehe Tabelle). In der ersten Stufe lief das Gel 45 min lang bei 1000 V und 20 mA. Wichtig war, dass die Bromphenolblaubande, mit welcher das Gel in der Äquilibration eingefärbt

wurde, vollständig aus dem Gel der 1. Dimension herausgelaufen war. Danach wurden IEF-Gelstreifen und Filterpapiere vom Gel entfernt. In der zweiten Stufe lief das Gel 160 min lang bei 1000 V und 40 mA. Diese Stufe wurde 5 min, nachdem die Bromphenolblaubande den anodischen Pufferstreifen erreicht hat, abgebrochen. Dadurch sollte verhindert werden, dass die Proteine in den Pufferstreifen und damit wieder aus dem Gel heraus wandern.

Tabelle 3 Einstellungen für SDS - PAGE bei ExcelGel SDS XL 12-14.

	Spannung	Stromstärke	Leistung	Zeit
Schritt 1	1000 V	20 mA	20 W	40 min
Schritt 2	1000 V	40 mA	40 W	160 min

Die Gele wurden dann aus der Elektrophoreseeinheit herausgenommen, von der Plastikfolie wurde das Kerosin mit destilliertem Wasser abgespült.

3.8. Gelfärbung

3.8.1. Coomassie - Färbung / Grundlagen und Materialien

Die Coomassie - Färbung ist eine weniger sensitive Färbung als die Silberfärbung, dafür aber viel einfacher durchführbar und besser für quantitative Analysen geeignet (Neuhoff et al., 1985).

Fixierlösung:

Essigsäure 100 %	500 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Färbelösung:

Coomassie Blue R 250	350 mg
Methanol 100 %	400 ml
Essigsäure 100 %	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Entfärbelösung:

Methanol 100 %	50 ml
Essigsäure 100 %	50 ml
Aqua dest	ad 1000 ml

3.8.2. Coomassie - Färbung / Durchführung

Die vom Kerosin abgewaschenen Gele wurden in eine Glasschale gegeben und dann vollständig mit Fixierlösung (siehe 3.6.1) bedeckt. 30 Minuten wurden die Gele dann in der Fixierlösung geschüttelt. Nachdem die Gele kurz abgewaschen wurden, wurden sie vollständig mit der Färbelösung bedeckt und ebenfalls 30 min darin geschüttelt. Daraufhin wurden sie 30 Minuten mit einer Entfärbelösung differenziert.

3.8.3. Silberfärbung / Grundlagen

Die Silberfärbung ist die sensitivste nicht-radioaktive Methode zur Färbung von Proteingelen. Hiermit können Proteinmengen von weniger als 1 ng nachgewiesen werden. Durch kleine Veränderungen kann man gefärbte Proteinspots auch für die Massenspektroskopie weitenutzen (Shevchenko et al., 1996). Da die Silberfärbung aus vielen Schritten besteht und recht störanfällig ist, haben wir uns für die Silberfärbung mit einem standardisierten Kit (PlusOne Silver Staining Kit, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) entschieden. Diese Färbemethode basiert im Wesentlichen auf der Arbeit von *Heukeshoven und Dernick* (Heukeshoven, Dernick, 1985).

Fixierlösung:

Ethanol 100 %	100 ml
Essigsäure 100%	25 ml
Aqua dest.	ad 250 ml

Sensitivierlösung:

Ethanol 100 %	75 ml
Glutardialdehyd (25% w/v)	1,25 ml
Natriumthiosulfatlösung (5% w/v)	10 ml
Natriumacetat	17 g

Aqua dest.	ad 250 ml
------------	-----------

Silberlösung:

Silbernitratlösung (2,5% w/v)	25 ml
-------------------------------	-------

Formaldehyd	0,1 ml
-------------	--------

Aqua dest.	ad 250 ml
------------	-----------

Entwicklungslösung:

Natriumcarbonat	6,25 g
-----------------	--------

Formaldehyd	0,05 ml
-------------	---------

Aqua dest.	ad 250 ml
------------	-----------

Stopplösung:

EDTA-Natrium	3,65 g
--------------	--------

Aqua dest.	ad 250 ml
------------	-----------

3.8.4. Silberfärbung / Durchführung:

Die Gele wurden mit Aqua dest. abgespült und in Glasschalen überführt. Die Lösungen wurden jeweils frisch hergestellt. Zunächst wurden die Gele 30 min in Fixierlösung geschüttelt, nachfolgend wurde für 30 min die Sensitivierlösung hinzugegeben. Jetzt wurden die Gele dreimal für 5 Minuten in destilliertem Wasser gebadet. Danach folgte die Silberlösung für 20 min, überschüssige Silber-Ionen an der Geloberfläche wurden durch zwei darauffolgende einminütige Waschgänge mit destilliertem Wasser entfernt. Die Gele wurden dann für maximal fünf Minuten in Entwicklungslösung gebadet. Der Vorgang wurde spätestens dann mit der Stopplösung beendet, wenn die Gelfärbung optimal erschien. Abschließend wurden die Gele dann erneut dreimal 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

3.8.5. Gellagerung

Die Gele wurden zunächst eine Stunde in einer Glycerinlösung getränkt. Dann wurden sie mit einer Viskose-Folie überzogen und getrocknet und konnten so gelagert werden. Wichtige Gele wurden mit einem Farbscanner eingescannt und digital gespeichert.

Glycerinlösung zur Gellagerung:

Glycerol (87% w/v)	25 ml
Aqua dest.	ad 250 ml

3.9. Gelauswertung

3.9.1. Eichung der IEF-Gele

Für die IEF - Gelstreifen liegen Eichkurven vor, die jedoch nur eine ungenaue Bestimmung des pH-Wertes an einer definierten Stelle im Gel erlaubt. Zur genauen Eichung der IEF-Gele wurden je 5 IEF - Elektrodenstreifen (Immobiline DryStrip) wie in der Beschreibung zur IEF - Elektrophorese (3.5) behandelt mit Ausnahme des Probenauftrags. Die Streifen wurden 12 Stunden rehydriert (Rehydrierlösung), danach wurden 30 µl des IPG - Puffers in die Applikationslöcher des Keramikträgers pipettiert. Die Elektrophorese wurde dann unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie in 3.5 beschrieben. Nach der Elektrophorese wurden die Streifen kurz mit destilliertem Wasser abgewaschen und in 1 cm lange Streifen geschnitten. Diese Stücke wurden mit 500 µl destilliertem Wasser versetzt. Nach 10 Minuten wurden die Gefäße 10 Sekunden kräftig geschüttelt und der pH -Wert unter standardisierten Bedingungen mit einer Messelektrode in der Lösung gemessen. Im destillierten Wasser diffundiert der Ampholyt aus dem Gelstreifen, so dass der gemessene pH-Wert dem mittleren pH-Wert in diesem Abschnitt des Gelstreifens entspricht. Folgende Abbildungen zeigen die pH-Verteilung für 11 cm linear und 18 cm nichtlinear Gelstreifen.

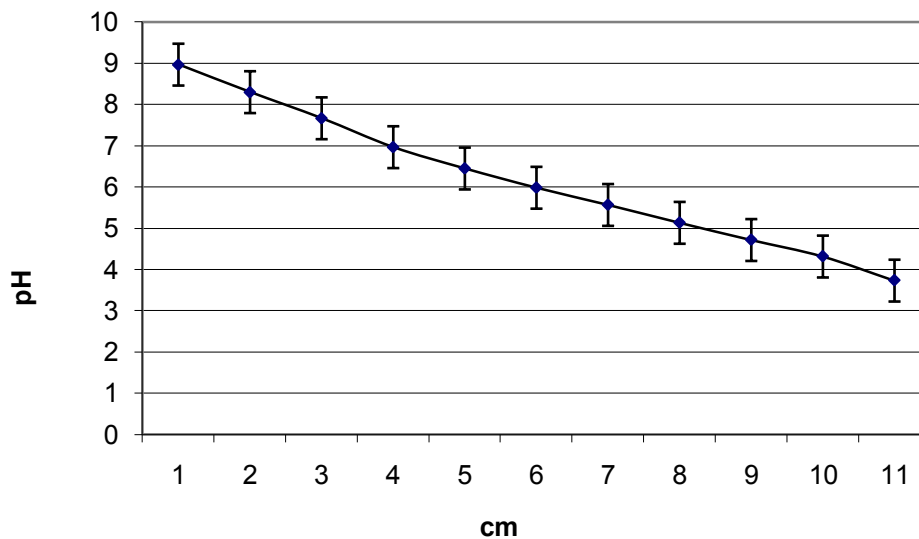


Abbildung 2 Eichdiagramm, pH - Wert - Verteilung in 11 cm IEF - Gel pH 3-10 linear

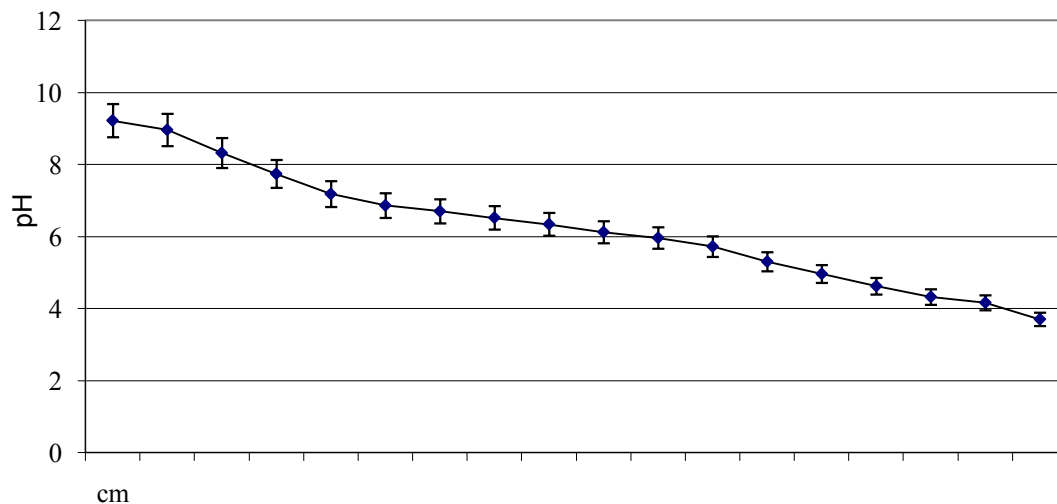


Abbildung 3 Eichdiagramm, pH-Wert - Verteilung in 18 cm IEF - Gelstreifen pH 3-10 nichtlinear

3.9.2. Auswertung der zweiten Dimension

Mit Hilfe der Eichung der IEF - Gele konnte auf dem SDS - PAGE Gel der pH - Wert einzelner Spots bestimmt werden. Die mitlaufenden Eichproteine erlauben eine Aussage über die Größe der Proteine. Eingescannte Gele wurden dann visuell miteinander verglichen.

4. Ergebnisse

Bei der Suche nach neuen analgetischen Wirkstoffen ist die Etablierung eines Schmerzmodells am Tier, hier bei der Ratte, der erste Schritt. Hierzu wurden der zuvor beschriebene Plantartest und der von Frey-Test, zwei etablierte Verhaltensstudien, durchgeführt (Starowicz et al., 2002 und Seltzer et al., 1990). Bei den operierten Tieren konnte am Tag 14 nach der Operation eine neu aufgetretene Neuropathie im Sinne einer Hyperalgesie (Plantartest) und Allodynie (von Frey-Test) nachgewiesen werden. Die Untersuchungen wurden jeweils an der ipsilateralen, operierten Pfote durchgeführt.

4.1. Thermische Hyperalgesie (Plantartest)

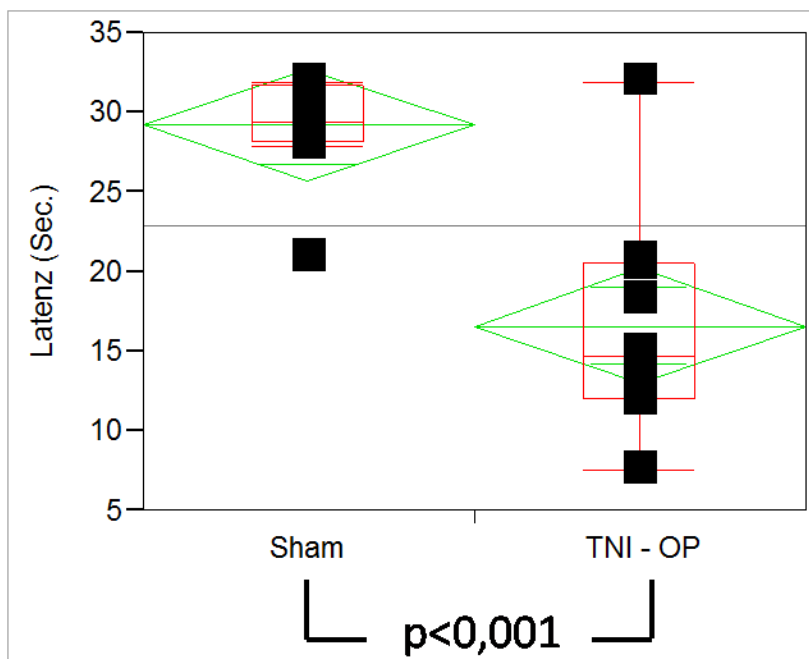


Abbildung 4 Effekte einer Transsektion des tibialen Nervus ischiadicus auf die thermische Hyperalgesie (Plantartest bei Ratten, Sham-operierte Tiere (n=10), TNI-operierte Tiere (n=10), 14 Tage postoperativ). Statistische Auswertung mit JMP – Software. Signifikanzberechnung mit Zweiprobent T-Test.

Der Plantartest dient zum Nachweis der thermischen Hyperalgesie als Symptom des chronischen Schmerzes. Hierbei wirkt ein Infrarotstrahl auf die

Rattenpfote als thermischer Schmerzreiz. Es wird die Zeit in Sekunden gemessen bis die Ratte die Pfote wegzieht. Der hier durchgeführte Plantartest konnte den Erfolg der TNI-Operation nachweisen. Die TNI-operierten Tiere (n=10) zeigten 14 Tage postoperativ eine signifikant ($p<0,001$) kürzere Latenzzeit in Reaktion auf den Schmerzreiz als die Sham-operierten Tiere (n=10). Eine Hyperalgesie auf thermische Reize konnte somit gezeigt werden (siehe Abbildung 4).

4.2. Mechanische Allodynie (von Frey-Test)

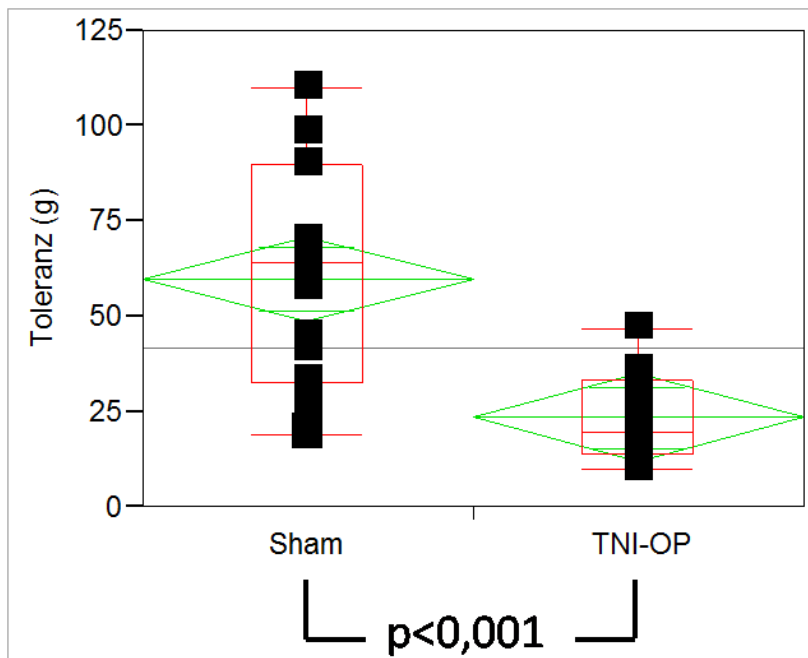


Abbildung 5 Effekte einer Transsektion des tibialen Nervus ischiadicus auf die mechanische Allodynie (Von-Frey-Test, Sham-operierte Ratten (n=15) und TNI-operierte Ratten (n=15), 14 Tage postoperativ). Statistische Auswertung mit JMP – Software. Signifikanzberechnung mit Zweiprobenn T-Test.

Der von Frey – Test ist eine Verhaltensstudie zur Untersuchung der mechanischen Allodynie. Hierbei wird mittels von Frey – Drahtfasern, die gegen die Hinterpfote gedrückt werden, der tolerierte Druck in Gramm (g) gemessen (Seltzer et al., 1990). Auch im von-Frey-Test zeigte sich die erfolgreiche TNI – Operation. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Tiere, die eine Neurotomie nach dem TNI - Modell erhalten haben, 14 Tage nach der

Operation einen signifikant ($p < 0,001$) geringeren Druck der von-Frey-Fasern tolerierten als die Sham-operierten Tiere. Somit konnte auch eine neu aufgetretene Allodynie bewiesen werden (siehe Abbildung 5).

4.3. Erstellung eines geeigneten Protokolls zur Darstellung des Proteoms

Neuronale Proteine, die in diesem Tiermodell als Antwort auf thermische Hyperalgesie und/oder Allodynie herauf reguliert werden, stellen interessante Zielstrukturen für die Entwicklung neuer analgetischer Medikamente dar. Als Screening-Verfahren zur Identifikation unbekannter Proteine eignet sich die Analyse des Proteoms durch 2D-Gelelektrophorese. Mit Hilfe der zweidimensionalen Elektrophorese sollte in dieser Arbeit daher das Proteom in den spinalen Ganglien des Nervus ischiadicus der Ratte nach neuropathischer Schmerzstimulation dargestellt werden. Zunächst musste die Methode im Labor etabliert werden.

4.3.1. Probenaufbereitung

In ersten Versuchen wurde zunächst eine geeignete Methode zur Zell-Lyse und -Homogenisation gesucht. Zahlreiche Lyse-Techniken sind bekannt (Ultraschall-Homogenisation, Enzymatische Lyse, Detergentien, mechanische Homogenisation, wiederholtes Einfrieren und Auftauen oder auch die Kombination von verschiedenen Methoden). Ziel der Lyse für die zweidimensionale Elektrophorese sollte ein Aufbrechen aller nicht-kovalenter Bindungen in Proteinkomplexen sein, um eine Aufspaltung in einzelne Polypeptide in der Lösung zu erhalten. Gleichzeitig sollte die Proteinmischung so wenig behandelt werden wie möglich, da durch Wärme, Enzyme und chemische Substanzen auch artifizielle Spots hervorgerufen werden. Zudem können verschiedene chemische Substanzen (zum Beispiel hohe Salzkonzentration) die Elektrophorese stören und unter Umständen die Darstellung von bestimmten Spots verhindern (Görg et al., 2004). In diesen Untersuchungen zeigte sich die Homogenisation mit Ultraschall als ungeeignet, auch in Kombination mit einer Lysierlösung aus Harnstoff und Detergentien, da

keine vollständige Zelllyse erreicht werden konnte. Eine alleinige Lyse mit einem Protein - Homogenisator nach Potter-Elvehjem brachte ebenfalls keine vollständige Zelllyse und dementsprechend nur unzureichende Spots in der zweidimensionalen Elektrophorese. Die besten Ergebnisse mit kompletter Zelllyse zeigten sich mit einer Kombination der Lysierlösung nach *O'Farrel* (O'Farrell, 1975) mit dem Potter-Homogenisator (siehe auch Materialien und Methoden 3.4.2).

Anschließend musste eine geeignete Methode zur Bestimmung des Proteingehalts in der Probe gefunden werden. Eine relativ genaue Bestimmung des Proteingehalts ist mit der BCA - Proteinbestimmungen nach *Smith et al.* (Smith et al., 1985) durchzuführen. Als ideale Proteinmenge hat sich in diesen Untersuchungen eine Proteinmenge von 3 mg/ml herausgestellt. Zu geringe Proteinmengen resultierten in zu geringer Ausprägung der Spots, bei höheren Proteinmengen verliefen die Spots ineinander und es bildeten sich linienförmige Verläufe der Protein-Spots. Zwei beispielhafte Gele sind im Folgenden gezeigt: Abbildung 6 zeigt ein Gel mit einer zu hohen Proteinkonzentration. Einige Spots verlaufen ineinander und bilden Linien, so dass die Spots nicht mehr zu unterscheiden sind und kleinere Spots in deren Nähe nicht mehr dargestellt werden. In Abbildung 7 wurde zu wenig Protein aufgetragen, so dass nur größere Proteinmengen sichtbar werden und weite Teile des Gels keine Protein-Spots zeigen.

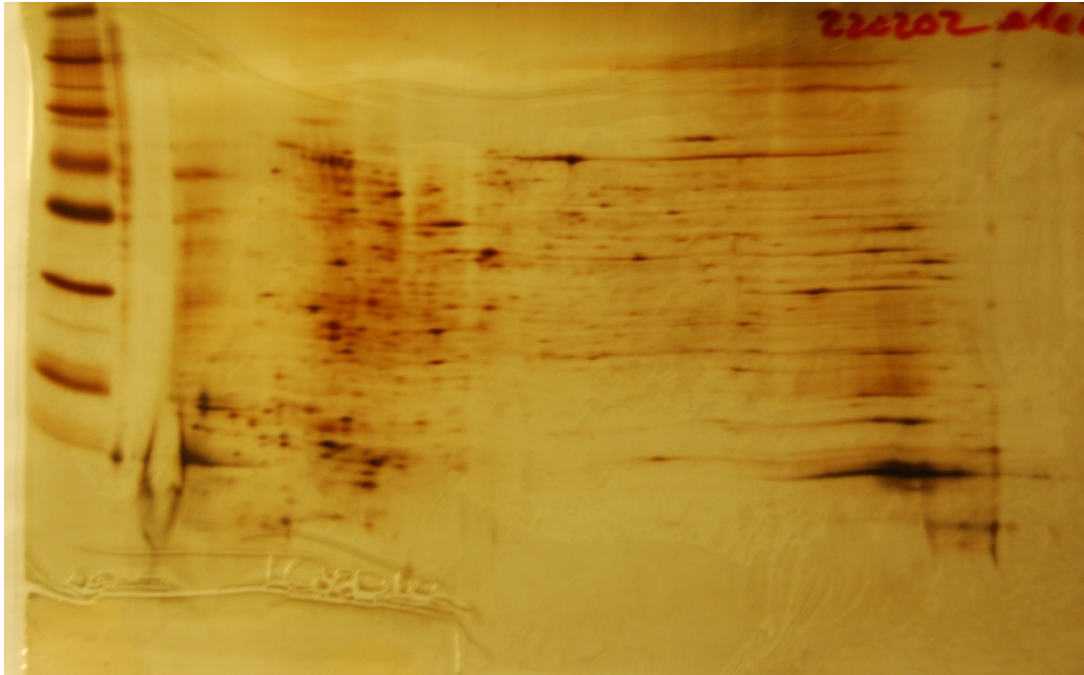


Abbildung 6 2D PAGE vom Spinalganglion (DRG) L4, Silberfärbung. Es zeigten sich linienförmige Verläufe der einzelnen Proteinspots durch eine zu hohe Proteinkonzentration.

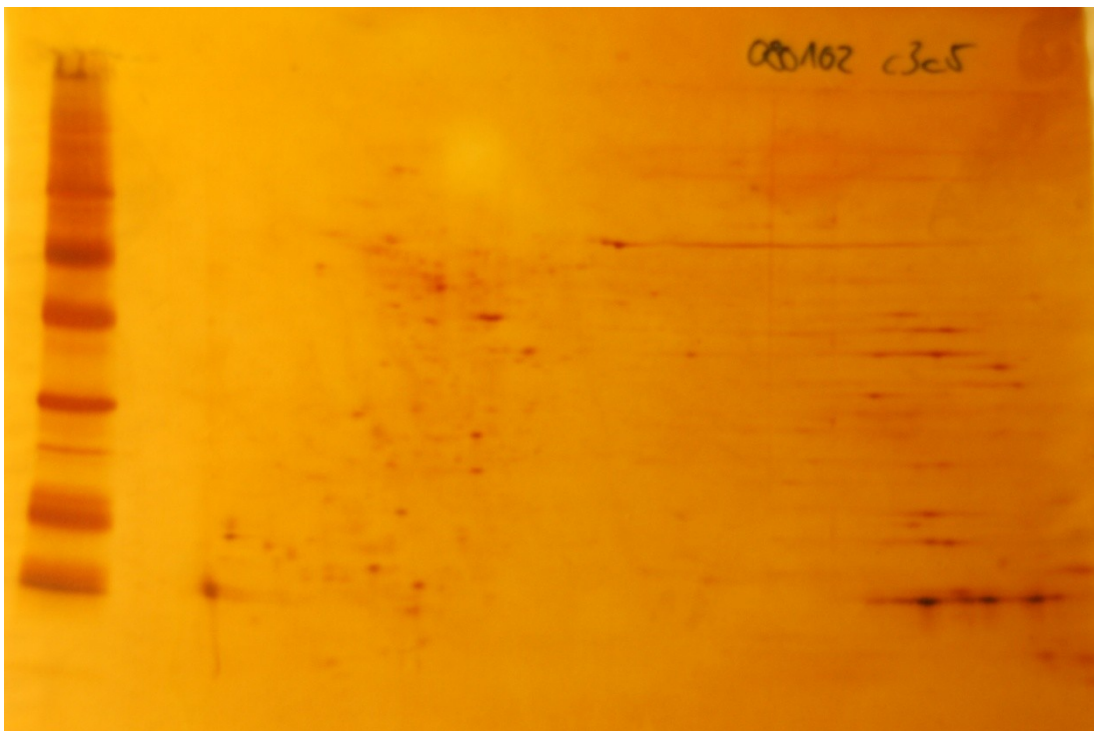


Abbildung 7 2D PAGE Gel vom Spinalganglion (DRG) L4, Silberfärbung. Eine zu geringe Proteinkonzentration zeigt zu wenig Protein-Spots.

4.3.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese (SDS – PAGE)

Die zweidimensionale Elektrophorese wurde im Wesentlichen in Anlehnung an das Protokoll von *Görg et al.* (Görg et al., 2004) durchgeführt. Diese Technik wurde in diesem Labor erstmalig etabliert. Es wurden Fertig-Gele der Fa. GE Healthcare genutzt. Trotz dieser Vereinfachung zeigte sich die Etablierung als zeitaufwendig und kompliziert. Insbesondere die Wahl der geeigneten Gel-Größen und die richtige Färbung waren entscheidend.

4.3.3. Wahl der Länge des IEF-Gelstreifens

Die Länge der Gelstreifen beeinflusst die Auflösung der Proteinproben entscheidend (Görg et al., 2003). Von der Fa. GE Healthcare werden verschiedene Gel-Streifenlängen zur Durchführung der IEF - Gelelektrophorese angeboten (Berkelmann, Westermeier 1998). In den ersten Versuchen wurden 11 cm, 13 cm und 18 cm IEF-Gelstreifen benutzt. Es zeigte sich schnell, dass die kurzen Gelstreifen die Auflösung der Spots deutlich verringern und für Studien mit einer großen Anzahl von Proteinen, wie bei der Untersuchung von spinalen Ganglien, nicht geeignet sind (Daten nicht gezeigt). Kurze Gelstreifen wären vorteilhaft bei der Untersuchung von kleinen Proteinzahlen, da zum Beispiel zwei IEF - Gele parallel auf einem SDS-Gel laufen können. Die 18 cm Gelstreifen zeigten hingegen die beste Auflösung der einzelnen Spots. Sie wurden daher für diese Untersuchungen benutzt.

4.3.4. Wahl des pH-/pI- Bereichs der IEF-Gelstreifen

Die IEF - Gelstreifen sind pH - Gradientengele, die einzelnen Proteine wandern also in der Elektrophorese zu der Stelle im Gel mit dem entsprechenden isoelektrischen Punkt. Um eine möglichst gute Auflösung der Gele zu erreichen, musste also ein geeigneter Gradient für das IEF - Gel gefunden werden. Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Gradienten in käuflichen IEF – Gelen. Es besteht die Möglichkeit, zwischen einem besonders breiten pI - Gradienten (zum Beispiel pI 3-10) zu wählen, um einen Überblick über die Proteinverteilung

zur erhalten. Genauso sind aber auch Gele für bestimmte pI - Bereiche erhältlich (zum Beispiel pI 4-7), wo besonders viele Spots zu erwarten sind. Zudem gibt es Gelstreifen, die nur einen sehr kleinen pI Gradienten haben (zum Beispiel pI 4-5), hiermit sind hochauflösende Gel-Studien möglich. Es besteht dann die Wahl zwischen einer linearen und nicht linearen Verteilung des Gradienten. Bei einem linearen Gradienten ist das Ablesen des isoelektrischen Punkts der einzelnen Spots besonders einfach. Nichtlineare IEF - Gele haben jedoch im Bereich von pI 5-7, wo bei komplexen Proteinproben besonders viele Spots zu erwarten sind, eine deutlich höhere Auflösung (Görg et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Gele mit einem breiten pI-Gradienten (3-10) benutzt, da das gesamte Proteom des spinalen Ganglions dargestellt werden sollte. Es zeigte sich, dass bei Nutzung eines linearen Gradienten zahlreiche Spots nicht aufgetrennt werden konnten und ineinander verliefen (Daten nicht gezeigt). Bei Nutzung von nichtlinearen IEF - Gelen konnten deutlich mehr Spots dargestellt werden, da viele Spots im Bereich von pI 5.5-7 lagen und mit diesen Gelen eine höhere Auflösung in diesen Bereichen erreicht werden konnte.

4.3.5. Färbung der SDS - Gele

Zahlreiche Methoden der Visualisierung von Proteinspots sind bekannt. Zur Färbung des gesamten Proteoms sind die Coomassie Blue -, die Silber-, die Fluoreszenz- oder die Autoradiographiefärbung geeignet. Einzelne Proteinspots kann man mit immunochemischen Blotting - Methoden identifizieren (Görg et al., 2004). In dieser Untersuchung sollte das gesamte Proteom dargestellt werden, so dass immunochemische Färbemethoden nicht in Betracht kamen. Im Labor waren keine Möglichkeiten zum Nachweis von Fluoreszenz- oder Autoradiographiefärbungen vorhanden. Es wurden daher Färbungen mit Coomassie Blue - und Silberfärbungen durchgeführt. Vor- und Nachteile der einzelnen Färbungen wurden kürzlich von Miller et al. diskutiert (Miller et al., 2006).

Die Coomassie - Blue - Färbung ist eine schnell und kostengünstig durchzuführende Färbung und daher eine häufig verwendete Technik in der Gelelektrophorese. Weitere Vorteile sind die Kompatibilität mit der Massenspektroskopie (im Gegensatz zur klassischen Silberfärbung) und die gute Eignung für die quantitative Analyse von Proteinspots (Westermeier, 2006). Es ist bekannt, dass diese Färbung jedoch nicht sehr sensitiv ist ($0,5\ \mu\text{g}$ Protein/Spot) und daher zahlreiche Spots nicht sichtbar werden (Görg et al., 2003). Auch in den hier durchgeführten Versuchen hergestellte Gele zeigten deutlich weniger Spots mit Coomassie Blue - Färbung (Abbildung 8).



Abbildung 8 2D PAGE vom Spinalganglion L4 (DRG), Coomassie Blue – Färbung.



Abbildung 9 2D PAGE vom Spinalganglions (DRG) L4 der Ratte. Deutlich mehr Proteinspots als bei einer Coomassie-Blue-Färbung sind zu erkennen (Visuelle Zählung der Spots: 687). Silberfärbung.

Die Silberfärbung ist in Ihrer klassischen Form nach *Merril et al.* eine hochsensitive Methode zur Visualisierung von Proteinen, die Nachweisgrenze liegt bei 0,01 µg Protein/Spot (Merril et al., 1981). Nachteilig bei dieser Methode ist jedoch die Tatsache, dass sie nicht kompatibel ist mit der Massenspektroskopie (Görg et al., 2004). *Shevchenko et al.* haben daher ein neues Protokoll entwickelt, welches die gleichzeitige Nutzung dieser Methode und die Untersuchung per Massenspektroskopie erlaubt (Shevchenko et al., 1996). Die Silberfärbung nach diesem Protokoll zeigte in den Gelen eine deutlich bessere Auflösung als bei Coomassie Blue gefärbten Gelen (Abbildung 9). Es wurde daher für weitere Versuche die Silberfärbung als Methode für die Gelfärbung gewählt.

4.4. Vergleich der SDS - Gele

Die zweidimensionalen Gele wurden visuell miteinander verglichen. Es wurden jeweils drei Gele angefertigt, um die Gele mit der höchsten Auflösung vergleichen zu können. Neue Spots in den Gelen wurden mit einem Pfeil markiert. Bei der manuellen Auswertung der Gele fiel bereits auf, dass einige Spots deutlich herauf- oder herabreguliert waren. Eine genaue quantitative

Aussage ließ jedoch die unterschiedliche Gelqualität und die manuelle Auswertung nicht zu. Dieses wäre nur mit automatischen Auswertungsmethoden möglich und setzt eine gleichmäßigere Gelqualität voraus. Ebenfalls ist die Silberfärbung zur quantitativen Auswertung nicht ideal (Görg et al., 2004).

4.4.1. Vergleich der zweidimensionalen Gele bei TNI-operierten und Sham-operierten Tieren, ipsilaterale spinale Ganglien L4

Die Gele wurden mit einer gemischten Probe von drei spinalen Ganglien L4 auf der ipsilateralen, operierten Seite beladen. Das erste Gel (Abbildung 10) zeigt das Proteom bei Sham-operierten Tieren, das zweite Gel (Abbildung 11) bei TNI - operierten Tieren. Durch den Vergleich von Proben aus Sham- und TNI – operierten Tieren sollten Proteinregulation infolge eines neuropathischen Schmerzreizes identifiziert werden. Es wurden jeweils mindestens drei Gele angefertigt, die Abbildungen zeigen die beste erreichte Auflösung.

Vier neu nachgewiesene Proteinspots als Antwort auf den Schmerzreiz bei den TNI - operierten Tieren zeigten sich vor allem im niedermolekularen Bereich von 10 - 25 kD und einem pH von 7,5 bis 8,5. Im Bereich von 30-35 kD wurden zwei neue Spots gezeigt, im Bereich von 50 bis 75 kD ein neuer Spot, alle bei einem pH von 6,5 bis 7,0. Ein weiterer Spot zeigte sich bei einem pH von 6,0 und 35 kD (Abbildung 11).

4.4.2. Vergleich der zweidimensionalen Gele bei TNI-operierten Tieren an den ipsilateralen und kontralateralen spinalen Ganglien L6

Die Gele wurden mit einer gemischten Probe von jeweils drei spinalen Ganglien L6 erstellt. Beide Proben stammen von TNI – operierten Tieren. Das erste Gel (Abbildung 12) zeigt das Proteom an der kontralateralen, nicht operierten Seite. Das zweite Gel (Abbildung 13) zeigt das Proteom an der ipsilateralen, also TNI-operierten Seite. Durch den Vergleich von Proben aus Sham- und TNI – operierten Tieren sollten Proteinregulation infolge eines neuropathischen

Schmerzreizes identifiziert werden. Auch hier zeigten sich deutliche Veränderungen im Gelvergleich. Insbesondere zeigte sich, dass neu regulierte Spots in ähnlichen Bereichen wie im Vergleich der OP – und Sham- Tiere zu sehen waren. Besonders fielen zwei Spots im Bereich vom pH 7 auf, mit einem Molekulargewicht von 30 kD bzw. 35 kD. Bei pH 7,5 traten zwei Spots zwischen 50 und 75 kD auf. Ein Spot im niedermolekularen Bereich von ca. 10 kD trat bei pH 8,5 auf. Im Vergleich der beiden Gele fielen auch hier mehrere hoch- bzw. herunterregulierte Spots auf.

Sämtliche Gele standen nun für die Identifizierung der differentiell exprimierten Proteinspots durch massenspektroskopische Analyse zur Verfügung. Insbesondere die beschriebenen neu aufgetretenen heraufregulierten Proteinspots nach Schmerzreiz stellen interessante Kandidatenstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente dar.

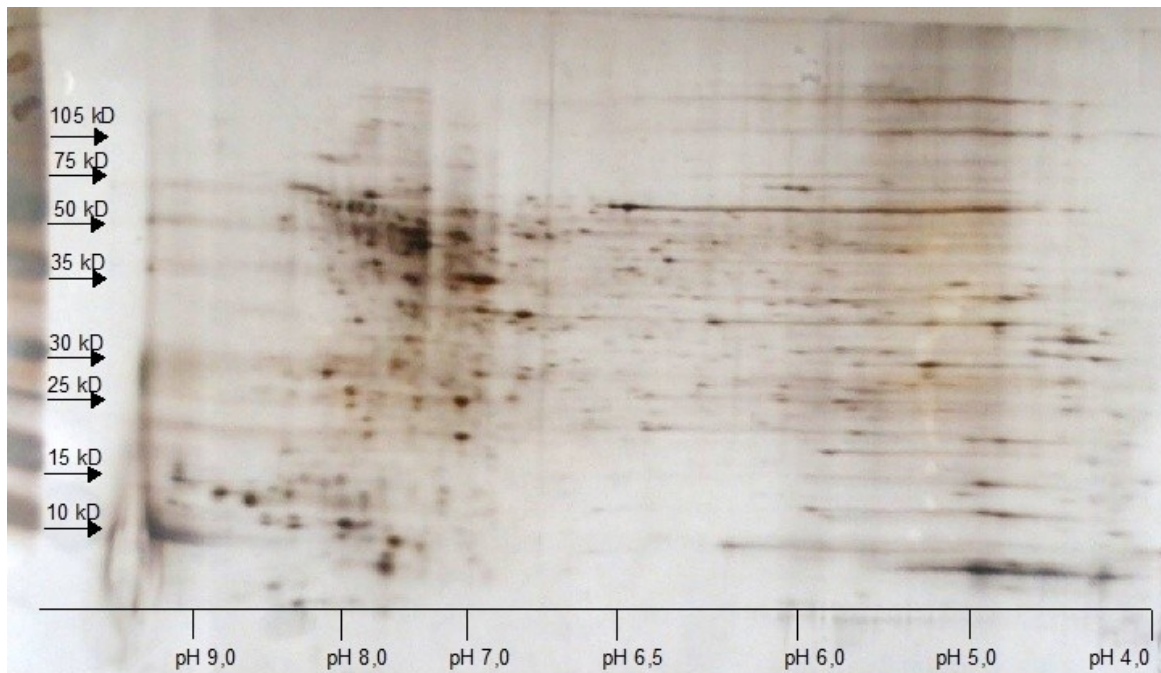


Abbildung 10 Zweidimensionale Elektrophorese von Spinalganglien (DRG) L4, ipsilateral, Sham-operierte Tiere.

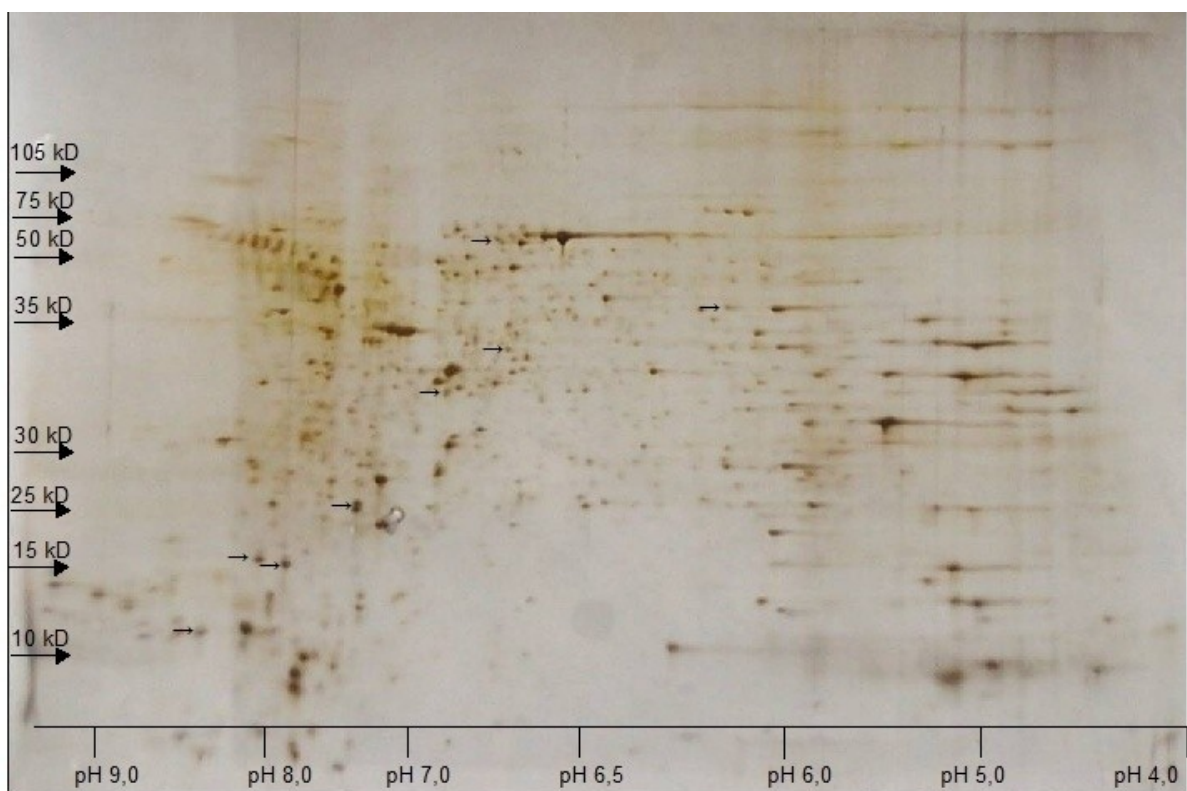


Abbildung 11 Zweidimensionale Elektrophorese von Spinalganglien (DRG) L4, ipsilateral, TNI-operierte Tiere. Nach Schmerzreiz heraufregulierte Proteinspots sind mit einem Pfeil markiert.

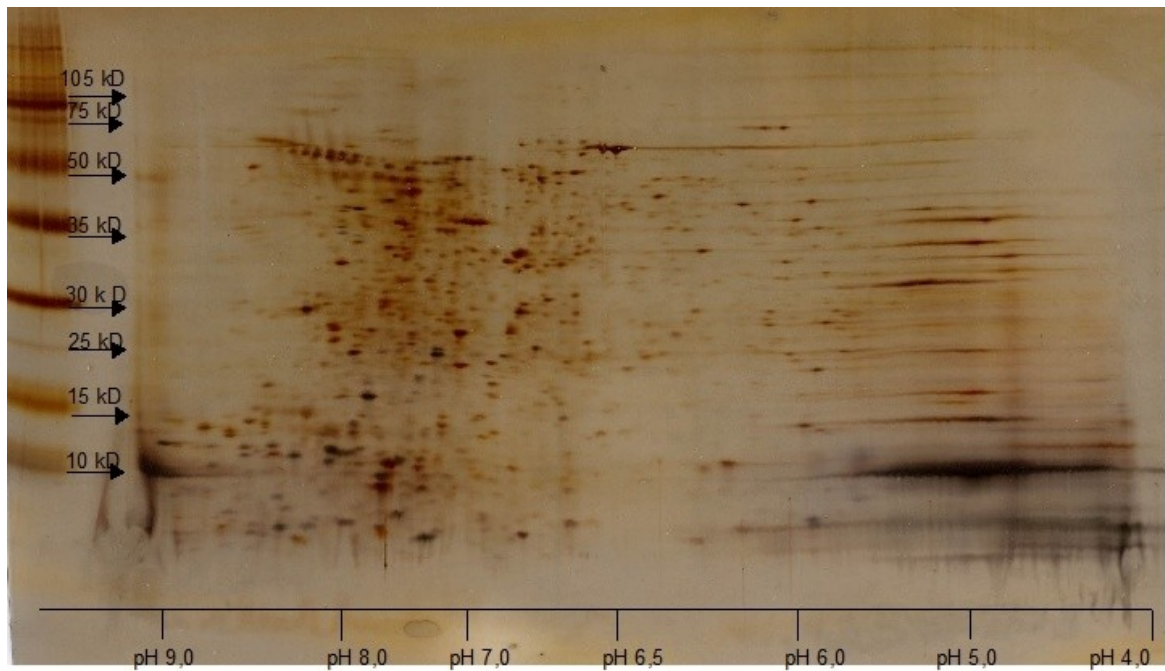


Abbildung 12 Zweidimensionale Elektrophorese von Spinalganglien (DRG) L6 der Ratte, kontralateral, TNI - operierte Tiere.

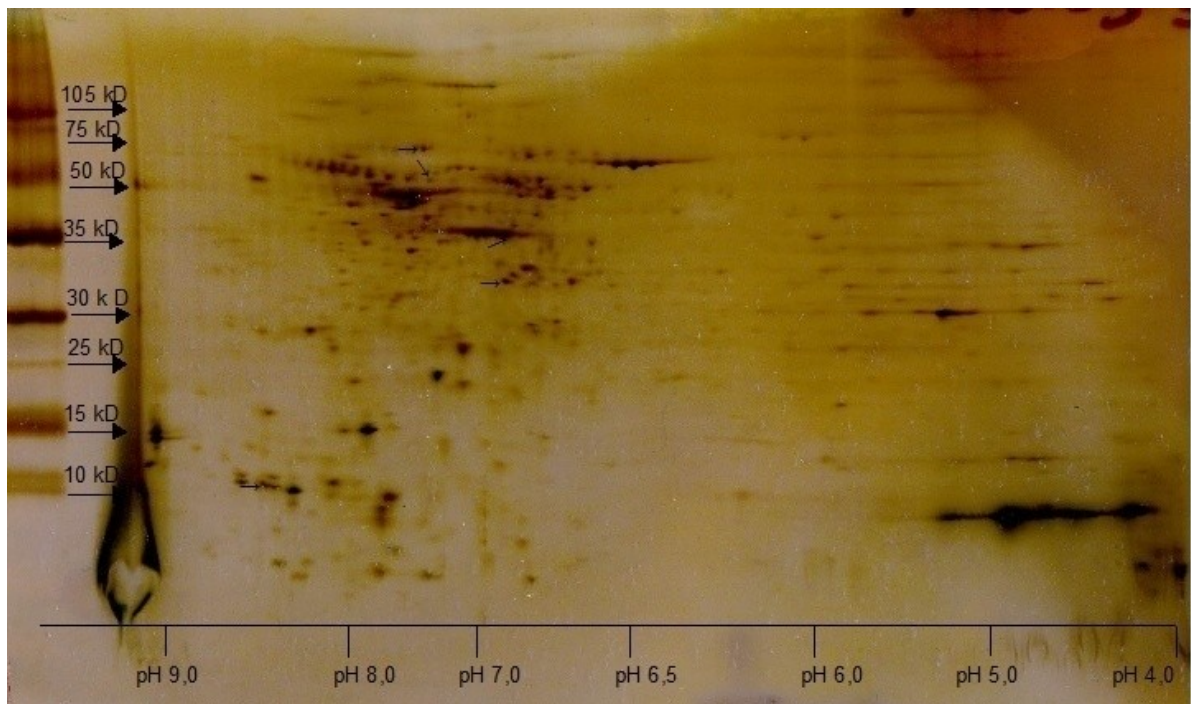


Abbildung 13 Zweidimensionale Elektrophorese von Spinalganglien (DRG) L6 der Ratte, kontralateral, TNI - operierte Tiere. Nach Schmerzreiz heraufregulierte Proteinspots sind mit einem Pfeil markiert.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde in einem schmerzpharmakologischen Tiermodell, dem „Tibial Nerve Injury – Modell“, ein neuropathischer Schmerz erzeugt und anschließend die Methodik zur Analyse des Proteoms am Spinalganglion mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese etabliert. Es konnten erstmalig unterschiedliche Proteinexpressionsmuster bei Spinalganglien von TNI – operierten Tieren gezeigt werden.

5.1. Die Bedeutung der Proteomik in der Schmerzpharmakologie und bei der Behandlung von neuropathischem Schmerz

Die pharmakologische Forschung hat die Aufgabe der Suche nach neuen Wirkstoffen zur Bekämpfung von Krankheiten. In den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts lag ein Schwerpunkt in der Genomforschung. Nachdem das gesamte menschliche Genom entschlüsselt war, taten sich zahlreiche neue mögliche Protein-kodierende Genloci auf, die als „Target“ für die Wirkstoffsuche dienen könnten. *Orth et al.* berichtet 2004 in *Expert Opinion on Therapeutic Targets* von mehr als 3000 Genloci (dort auch als „druggable Genome“ bezeichnet), wovon bisher allerdings nur 500 für Wirkstoffe genutzt werden. Die Untersuchung des Genoms hat jedoch nicht zur gewünschten Steigerungsrate bei neuen pharmakologischen Wirkstoffen geführt (*Orth et al.*, 2004). Das liegt insbesondere an der Komplexität der Moleküle, aber auch an den Veränderungen, die *in vivo* nach der Translation zum Protein gemacht werden, wie z.B. Glykosylierungen und Phosphorylierungen (*Huber*, 2003). Zudem ist die Proteinexpression interindividuell sehr variabel und abhängig von z.B. von Alter, Umweltbedingungen oder Erkrankungen. (*Niederberger, Geisslinger*, 2008). Daher wird geschätzt, dass die Anzahl der Proteine im menschlichen Organismus ungefähr 10 – 100fach höher ist als die Anzahl der Gene, was einer absoluten Zahl von 50.000 bis 500.000 einzelnen Proteinen entspricht (*Qoronfleh*, 2006). Untersuchungen des Proteoms ergeben die Möglichkeit, molekulare Veränderung der Proteine bei bestimmten Krankheiten

zu finden, die als Angriffspunkte bzw. „Targets“ für neue Wirkstoffe dienen könnten. Bei vielen Erkrankungen sind die Veränderungen auf der Proteinebene bislang nicht verstanden. Die große Mehrzahl verfügbarer Medikamente richtet sich gegen Proteine und nicht gegen Gene. Proteine sind daher in der pharmakologischen Wirkstoff-Forschung von besonderer Wichtigkeit.

Die Therapie des neuropathischen Schmerzes ist weiterhin kompliziert und häufig auch sehr unbefriedigend. Trotz zahlreicher Pharmaka, wie Opiode, nonsteroidale Antirheumatika, Antikonvulsiva und trizyklische Antidepressiva, sind die Behandlungserfolge nicht ausreichend (Chen et al, 2004 und Wang, Wang, 2003 und Baron, 2006). Die Behandlung wird nicht nur durch schlechte Wirkung, sondern auch durch eine Vielzahl von unerwünschten Nebenwirkungen erschwert. Zudem ist der Wirkmechanismus der meisten Analgetika bisher nur unvollständig erklärt worden (Kingery, 1997). Es ist daher dringend notwendig, neue Substanzen zur Behandlung des neuropathischen Schmerzes zu finden. Jedoch sind die molekularen Mechanismen auch beim neuropathischen Schmerz nur in Ansätzen verstanden.

In der Einleitung dieser Arbeit wurde bereits von der Übersichtsarbeit von *Campbell und Meyer* berichtet, die besagt, dass beim neuropathischen Schmerz „eine sehr vielfältige Biologie am Werk ist“. Neue Mechanismen der neuropathischen Schmerzentstehung wurden entdeckt, aber von einem vollständigen Verständnis der Pathogenese ist man noch weit entfernt (Campbell, Meyer, 2006). Dieses ist aber bedeutsam für eine Entwicklung von spezifisch wirksamen Substanzen. *Niederberger und Geisslinger* halten daher die Proteomik weiterhin für eine geeignete Technik, schmerzassoziierte Proteine im Nervengewebe zu detektieren und hier neue „Targets“ zur Entwicklung neuer Schmerzmedikamente zu finden (Niederberger, Geisslinger, 2008).

5.2. Tierexperimentelle Verhaltensstudien

Nach wie vor haben Tiermodelle eine große Bedeutung in der schmerzpharmakologischen Forschung. Es wird zwar seit Jahrzehnten an *in vitro* Zellkulturmodellen zum neuropathischen Schmerz geforscht, doch aufgrund der komplexen pathogenetischen Mechanismen besteht der Zweifel, dass in *in vitro* Modellen die Rezeptoren, Ionenkanäle und Modulatorproteine genauso exprimiert werden wie in *in vivo* Modellen. Es ist anzunehmen, dass sich diese Nachteile jedoch mit Weiterentwicklung von molekulargenetischen Techniken und der daraus bestehenden Möglichkeit, systematisch die DNA- und Proteinexpression zu untersuchen, verringern. Durch die zahlreichen Tiermodelle konnte das Verständnis der Schmerzpathologie deutlich verbessert werden (Wang, Wang, 2003).

Es gibt zahlreiche *in vivo* Modelle zum neuropathischen Schmerz. Obwohl im Tierexperiment eine direkte Evaluation der Schmerzwahrnehmung nicht möglich ist, wurden einige Indikatoren beschrieben, die man zur Erfassung von neuropathischen Schmerzen bei Versuchstieren nutzen kann. Spontane Schmerzen werden als Zurückziehen der Pfote, das Anheben und Hinken und das übermäßiges Putzen und Beißen beobachtet (Bennett, Xie, 1988). Einige weitere Symptome des neuropathischen Schmerzes können in Tiermodellen untersucht werden. Dazu gehören auch die taktile und kalte Allodynie, sowie die thermische und mechanische Hyperalgesie, die beide in dieser Arbeit exemplarisch zum Nachweis der Ausbildung eines neuropathischen Schmerzes genutzt wurden (Wang, Wang, 2003). Die taktile Allodynie wird mit den sogenannten von Frey – Fasern untersucht. Dieser Test ermöglicht eine einfache und quantitativ durchführbare Untersuchung der Tiere (Chaplan et al., 1994). Zudem wurde im Plantartest nach Hargreaves et al. die mechanische Allodynie nachgewiesen (Hargreaves et al., 1988). Auch dieser Test ermöglicht eine schnelle und einfache Quantifizierung.

Man kann zwischen zentralen und peripheren Modellen des neuropathischen Schmerzes unterscheiden. Zentrale Schmerzmodelle arbeiten in der Regel mit

einer Durchtrennung oder Läsion des Rückenmarks (Bennett et al., 2000) und sind wichtig für das Verständnis von Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie Rückenmarkschädigung und Multiple Sklerose, und dadurch bedingten neuropathischen Schmerzen. Periphere Schmerzmodelle wurden ausführlich bereits in der Einleitung beschrieben. Auch diese sind von großer Bedeutung, da die Mehrzahl der Patienten an einem peripher induzierten neuropathischen Schmerz leiden (Baron, 2006). Die wichtigsten Modelle arbeiten mit einer unilateralen Manipulation des Nervus ischiadicus, wobei die zuerst entwickelten Modelle eine Ligatur im Bereich des Nervus ischiadicus (Bennett, Xie, 1988) oder der L5 / L6 Spinalnerven vornehmen (Kim, Chung, 1992). Diese Methoden haben mehrere Nachteile: insbesondere ist sie schwierig in der operativen Durchführung, zudem bringt man Fremdmaterial in das Versuchstier und löst eine lokale Entzündungsreaktion mit nachfolgenden molekularen Veränderungen aus. Daher wurden in den letzten Jahren weitere Modelle veröffentlicht, die Teile des Nervus ischiadicus durchtrennten. Sowohl in den Arbeiten von *Lee et al.* (Lee et al., 2000) (Nervus tibialis und Nervus suralis) und *Decosterd und Woolf* (Decosterd, Woolf, 2000) „Spared Nerve Injury – Modell“ (SNI; Nervus tibialis und Nervus peronealis communis) wurden zwei periphere Äste des Nervus ischiadicus durchtrennt. In beiden Modellen konnte eine thermische Hyperalgesie und mechanische Allodynie nachgewiesen werden. Im SNI – Modell wurde zudem eine kalte Allodynie beschrieben und eine taktile Allodynie (Polgar, Todd, 2008). Kürzlich konnte von *Pertin et al.* gezeigt werden, dass das SNI – Modell auch nach Sympathektomie, dass bedeutet unabhängig vom Sympathikus, neuropathischen Schmerz erzeugt (Pertin et al., 2007). Diese Symptome sind repräsentativ für einen neuropathischen Schmerz, wie er auch beim Menschen beschrieben wird (Woolf, Mannion, 1999).

In dieser Arbeit wurde das „Tibial Nerve Injury“ Modell (TNI – Modell) nach *Hofmann et al.* genutzt. Dieses Modell wurde parallel zu den beiden anderen Tiermodellen mit nervöser Transsektion entwickelt und zeichnet sich durch eine besonders einfache operative Durchführung aus. Die Autoren konnten, wie auch in den beiden oben genannten Modellen, die Entstehung einer

thermischen Hyperalgesie und mechanischen Allodynie nachweisen, wenngleich sie auch eine unterschiedliche Ausprägung im Vergleich mit dem SNI – Modell beschreiben (Hofmann et al., 2000 und Hofmann et al., 2003). In den Ergebnissen konnte in dieser Arbeit ebenfalls die Entstehung dieser beiden wichtigen Symptome nachgewiesen werden. Hinweise auf eine Autotomie ergaben sich bei dem TNI –Modell im Gegensatz zu anderen Modellen nicht. Ebenso zeigte sich, dass alle in diesem Modell untersuchten Tiere eine Allodynie und Hypersensitivität entwickelten. Eine Arbeit von *Erichsen et al.* konnte nachweisen, dass beim SNI – Modell 20 % der Tiere keine mechanische Allodynie entwickelten (Erichsen, Blackburn-Munro, 2002). Dieses wurde im TNI – Modell nicht gesehen und zeigte sich auch in den in dieser Arbeit berichteten Versuchen nicht. Zudem stehen bislang in dem TNI – Modell Untersuchungen aus, ob eine kalte oder taktile Allodynie entsteht oder ob eine Sympathektomie Auswirkungen hat (Hofmann et al., 2003), die für andere Modelle, insbesondere das SNI-Modell durchgeführt wurden. Obwohl Hofmann et al. in der Erstbeschreibung von einer weniger starken Ausprägung der mechanischen Allodynie berichtet, zeigt sich in den hier vorgestellten Versuchen, dass sich sowohl Hyperalgesie als auch Allodynie nach TNI – Operation ähnlich deutlich zeigen. In den hier gezeigten Versuchen wurde die Vergleichsgruppe scheinoperiert (Sham), d.h. der Nerv wurde zwar freipräpariert aber nicht durchtrennt. Dieses Vorgehen soll Artefakte und Proteinveränderungen vermindern, die allein durch den operativen Zugang entstehen und wurde so auch bereits durch Hofmann et al. durchgeführt (Hofmann et al., 2000).

Die aktuell veröffentlichten Untersuchungen an einem neuropathischen Tiermodell mit nervöser Dissektion wurden jedoch fast ausschließlich mit dem SNI (spinal nerve injury) – Modell durchgeführt (z.B. Erichsen, Blackburn-Munro, 2002 und Pertin et al., 2007 und Polgar, Todd, 2008 und Moss et al., 2008). Im SNI – Modell wird der Nervus tibialis und Nervus peronealis communis durchtrennt. Es ist anzuerkennen, dass dieses Modell sich in den letzten Jahren in der Schmerzforschung durchgesetzt hat.

5.3. Molekularbiologische Untersuchungen

Verschiedene Untersuchungen der molekularbiologischen Veränderungen in peripheren neuropathischen Schmerzmodellen sind bereits durchgeführt worden. Es konnte dabei eine Vielzahl von Regulationen in der Gen-, wie auch in der Proteinexpression *in vivo* festgestellt werden, die teilweise auch zu einem besseren Verständnis der molekularen Veränderungen bei neuropathischem Schmerz geführt hat. (Wang et al., 2002 und Costigan et al., 2002 und Jimenez et al., 2005 und Komori et al., 2007). Beispielsweise konnte in der Arbeit von *Jimenez et al.* gezeigt werden, dass sich das Muster der Proteinexpression im zeitlichen Verlauf nach Nervenläsion verändert (Jimenez et al., 2005). *Komori et al.* fanden heraus, dass neben einer Regulation der Proteinexpression im betroffenen Spinalganglion L5 auch ein verändertes Proteinmuster in dem benachbarten Spinalganglion L4 (Komori et al., 2007) zeigt.

Auch gibt es mittlerweile einige neue Ansätze der Pharmakotherapie von neuropathischen Schmerzen, die auf diesen Forschungen basieren. So sind derzeit Histamin H3-Rezeptor Antagonisten in der klinischen Entwicklung, die zumindest im peripheren neuropathischen Tiermodell eine Wirksamkeit zeigen (Sander et al., 2008), ein klinischer Nachweis der Wirksamkeit am Patienten wurde bislang nicht veröffentlicht. Vielversprechend sind auch die Studien an Cannabinoid – Rezeptoren, wobei einige Wirkstoffe als selektive CB2 – Inhibitoren in der Entwicklung stehen. Es gibt zwei bekannte Cannabinoid – Rezeptoren, CB1 und CB2. CB1 – Rezeptoren vor allem im zentralen Nervensystem zu finden, hingegen sind die CB2 – Rezeptoren häufiger im peripheren Nervensystem nachzuweisen. Durch die selektive Wirkung auf den CB2 – Rezeptor werden die zentralen Nebenwirkungen am CB1 – Rezeptor vermieden (wie z.B. Hypothermie, Hypoaktivität) (Guindon, Hohmann, 2008).

Am TNI – Modell wurden bereits molekularbiologische Veränderungen auf Genom- und Transkriptionsebene von Hofmann et al. untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich die mRNA – Expression verschiedener Gene im Spinalganglion (DRG) nach tibialer Transsektion deutlich verändert. Galanin

und VIP werden deutlich hochreguliert, während Substanz P und CGRP herunter reguliert wird (Hofmann et al., 2003). Diese Befunde stimmen mit Ergebnissen überein, die an anderen neuropathischen Schmerzmodellen, unabhängig von der Art der Läsion am peripheren Nerven, erhoben wurden (Nahin et al., 1994 und Honore et al., 2000 und Fukuoka et al., 1998). Auch in anderen Geweben wurde die Genexpression nach Durchführung des TNI – Modells untersucht: so konnte eine Hochregulation am Cannabinoid CB1/CB2 – Rezeptor im Thalamus gezeigt werden, welcher für die Wirkstoffsuche besonders interessant ist (Siegling et al., 2001). Da am SNI – Modell die Hochregulation der Cannabinoid-Rezeptoren auch für Spinalganglien (DRG) nachgewiesen werden konnte (Guindon, Hohmann, 2008), ist es denkbar, dass dieses auch im TNI – Modell zu finden wäre. Bislang gibt es noch keine Arbeiten, die eine Proteomanalyse der Spinalganglien am TNI – Modell gezeigt haben (Pubmed-Literaturrecherche März 2009).

Wie in einer aktuellen Übersichtsarbeit von *Niederberger et al.* berichtet wird, sind die molekularen Mechanismen des neuropathischen Schmerzes aber weiterhin weitgehend unverstanden, und eine Klärung dieser Mechanismen zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien ist unbedingt wichtig. Besonders Proteinveränderungen in neuropathischen Schmerzmodellen könnten dabei entscheidende Hinweise geben (Scholz, Woolf, 2002 und Niederberger, Geisslinger, 2008). Von mehreren Autoren wird die Proteom-Analyse von Nervenzellen als schwierig dargestellt. So schreiben *Choudhary und Grant* 2004 in *Nature Neuroscience*, dass die Neurowissenschaftliche Proteomanalyse noch in den Kinderschuhen steckt, was auch an dem komplexen Aufbau der Neuronen liegt (Choudhary, Grant, 2004). *Niederberger und Geisslinger* berichten, dass die Aufarbeitung von Nervengewebe zunächst ein komplexes und heterogenes Zellgemisch ergibt, welches in der 2D – Elektrophorese nicht aufgetrennt werden kann (Niederberger, Geisslinger, 2008).

Einige andere Proteomstudien wurden in den letzten Jahren anhand unterschiedlicher Tiermodelle durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich bei allen untersuchten Modellen Veränderungen im neuronalen Proteom nachweisen lassen. Ein Vergleich ist jedoch wegen der verschiedenen Tiermodelle und verschiedenen untersuchten Punkte schwierig möglich. Insbesondere zeigten sich sehr unterschiedliche regulierte Proteine, was durchaus an den bislang wenigen Studien oder aber auch an dem sehr unterschiedlichem Design dieser Untersuchungen (Niederberger, Geisslinger 2008) liegen kann. Drei Arbeiten zeigen das Proteom nach Ligatur im Bereich der Spinalnerven nach Kim und Chung (Kim, Chung, 1992): *Komori et al.* haben in einer Arbeit zeigen können, dass bei Ligatur des Spinalnerven an L5 67 Proteine im ipsilateralen Ganglion der Hinterwurzel (DRG) herauf oder herab reguliert werden (Komori et al., 2007). *Lee et al.* untersuchten das Rückenmark nach Ligatur an L5 und L6 und konnten Veränderungen in 5 Proteinen feststellen (Lee et al., 2003). Eine Studie von Alzate et al. konnte Regulierungen an 21 Proteinen im Hirnstamm nach Ligatur an L5/L6 nachweisen (Alzate et al., 2004). Eine Arbeit von *Katano et al.* zeigte nach Partial Nerve Injury nach *Decosterd und Woolf* (Decosterd, Woolf, 2000) eine Veränderung in 15 Proteinen (Katano et al., 2006).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmalig das Proteom am Spinalganglion nach Durchführung des TNI – Modell im Vergleich mit scheinoperierten Tieren gezeigt werden. Bei der hier entwickelten Methode ergaben sich zunächst verschiedene Problematiken: zunächst musste eine geeignete Methode zur Probenaufarbeitung und Lyse gefunden werden. Hierbei müssen zwar die Proteine aus Ihrer Matrix in der Zelle herausgelöst werden, dürfen dabei aber auch nicht zerstört werden. Es stellte sich heraus, dass einige Methoden nicht geeignet waren, ein auftragbares Homogenisat zu erstellen, zum Beispiel die Ultraschall-Homogenisation oder eine Gefrier-Homogenisation. Eine Kombination aus Lysierlösung mit Harnstoff und Detergentien nach *Görg et al.* (Görg et al., 2004) und der mechanischen Homogenisation nach Potter – Elvehjem (Lenstra, Bloemendal, 1983) zeigten die besten Ergebnisse und wurden daher hier genutzt.

Bedeutsam war ebenfalls die Wahl der passenden Gele. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Fertig-Gele verwendet, wie sie von *Görg et al.* beschrieben werden (Görg et al., 2004). Aufgrund der Vielzahl der Proteine, die in einem Spinalganglion zu finden sind, hat sich in dieser Arbeit gezeigt, dass sowohl eine möglichst große Gelfläche, ein großer Molekulargewichtsbereich als auch ein großer pI – Gradienten vorteilhaft sind. Da es in dieser Arbeit zunächst um eine umfassende Darstellung des Proteoms der Spinalganglien ging, wurden in der ersten Dimension (IEF – Fokussierung) Gele mit einem breiten pI – Gradienten gewählt. In der zweiten Dimension (SDS – PAGE) wurden Gele mit einer großen Fläche gewählt. Möglicherweise ist es in weiterführenden Arbeiten sinnvoll, gezielt einen kleinen pI – Gradienten auszuwählen, um eine bessere Auflösung zu bekommen. IEF - Gele mit einem nicht-linearen pI -Gradienten könnten zu einer verbesserten Auflösung in Bereichen führen, wo besonders viele Spots erwartet werden (Görg et al., 2004). Diese Gele machen es allerdings schwieriger, den pI eines einzelnen Spots zu bestimmen und wurden daher hier nicht genutzt.

Zur Visualisierung der Spots nach Beendigung der 2D – Gelelektrophorese ist die Färbung unerlässlich. In dieser Arbeit wurden die Versuche mit zwei bereits etablierten Färbemethoden durchgeführt. Aufgrund der besseren Auflösung zeigte die Silberfärbung gegenüber der Coomassie Blue Färbung klare Vorteile, wenngleich diese deutlich zeitaufwendiger war, wie es auch von anderen Autoren beschrieben wurde (Raymer, Smith, 2007). Die Anzahl der sichtbaren Spots war um ein vielfaches höher. Um nach der Silberfärbung die Gele auch für die Massenspektroskopie zu nutzen, muss jedoch eine modifizierte Methode der Silberfärbung genutzt werden (Shevchenko et al., 1996). Zum Zeitpunkt der Versuche war die inzwischen häufig genutzte Difference Gel Electrophoresis (DIGE) noch nicht verfügbar. Sicherlich ist diese Technologie bei vergleichenden Proteomstudien sehr interessant, da sie den quantitativen Vergleich von Proteomuntersuchungen an zwei oder mehr Proben erlaubt und damit die Intergelvarianzen reduziert (Timms, Cramer, 2008, Shaw et al., 2003, Tonge et al., 2001).

Einen weiteren neuen Ansatz mit höherer Sensitivität im Vergleich zur 2D-Gelelektrophorese stellen Gel-freie Methoden der Proteomanalyse dar, die alle mit der Markierung durch stabile Isotope arbeiten. Bei dem „stable isotope labelling with amino acids in cell culture (SILAC)“ werden die Proteinproben als Zellkultur mit stabilen Isotopen markiert. Mit ICAT (Isotope coded affinity tag) können die Isotope chemisch an die Proteine gebunden werden. Durch die Massenspektroskopie werden die so gewonnenen markierten Proteine identifiziert. Die Isotope erlauben in der Massenspektroskopie auch eine Quantifizierung der einzelnen Proteine. Eine Vielzahl von Proteinen können mit diesen Methoden entdeckt und quantifiziert werden (Ong et al, 2003, Lu et al., 2009). Auch diese Methode stand zu Beginn dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

Einen interessanten Ansatz stellt auch die quantitative Analyse des Proteoms in neuropathischen Schmerzmodellen dar. Bei bereits bekannten Proteinspots kann mit der oben erläuterten 2D-DIGE eine quantitative Aussage getroffen werden, was mit der hier gebrauchten Silberfärbung aufgrund des limitierten dynamischen Bereiches nicht möglich ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass mehrere Proben auf demselben Gel aufgetragen werden und somit unter gleichen Bedingungen laufen können. Hierdurch entfällt das Problem der Intergelreproduzierbarkeit. Zudem ist mit der 2D DIGE – Gelelektrophorese nur sehr wenig Material notwendig, um Spots zu sehen (Shaw et al., 2003 und Sitek et al., 2006). Mit diesen Methoden kann eine große Menge an Proteinen untersucht werden. Es gibt jedoch auch einige Limitationen. Sowohl besonders große als auch besonders kleine Proteine können in der 2D – Gelelektrophorese nicht oder nur schlecht dargestellt werden (Huang et al., 2008). Desweiteren sind hydrophobe Membranproteine nur schlecht darzustellen. Gleichwohl wird jedoch angenommen, dass diese Proteine als Rezeptoren oder Ionenkanal eine wichtige Rolle in der Regulation des neuropathischen Schmerzes haben. (Sander et al., 2008 und Ji, Suter, 2007 und Niederberger, Geisslinger, 2008). Weitere Verbesserungen der Methodik sind daher dringend erforderlich. Eine Alternative könnten Gel-freie Proteomuntersuchungen (z.B. die bereits erwähnte ICAT) sein. Aufgrund der Methodik werden auch hydrophobe Proteine dargestellt. Damit können deutlich

mehr Membranproteine von Nervengewebe dargestellt werden als in herkömmliche, Gel-basierten Proteomanalysen. Zudem ist eine genaue Quantifizierung möglich (Aiping et al., 2009).

Die Auswertung der Gele erfolgte in dieser Arbeit visuell. Bei Vergleich der Proben aus ipsi- und kontralateralen Spinalganglien operierter Tiere konnten Unterschiede in der Proteinexpression nachgewiesen werden, ebenso bei ipsilateralen Spinalganglien von operierten und scheinoperierten (Sham) – Tieren. Damit konnten reproduzierbar Veränderungen der Proteinexpression in neuropathischen Schmerzmodellen gezeigt werden. Entsprechende Studien an anderen neuropathischen Schmerzmodellen berichten ebenfalls von einer veränderten Proteinexpression: In der bereits erwähnten Arbeit von Komori et al. konnten an einem Tiermodell mit Ligatur (Ligatur – Modell nach Kim und Chung) mit Hilfe von der 2D – DIGE Methode 67 Spots mit signifikanten Veränderungen beschrieben werden (Kim, Chung, 1992).

5.4. Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigte Methodik zur Darstellung des Proteoms am Spinalganglion und seiner Veränderungen nach Durchführung des TNI – Modells ermöglicht nun in weiterführenden Arbeiten eine Untersuchung der einzelnen veränderten Spots. Mit Hilfe der Massenspektroskopie können einzelne Spots qualitativ näher identifiziert werden: hier wird häufig die MALDI – ToF – Massenspektroskopie (Matrix-unterstützte Laser-Desorption - Time of Flight) genutzt, womit eine Sequenzierung der Peptide eines Proteins möglich ist und somit auch eine qualitative Analyse des Spot durchzuführen ist (Aebersold, Mann. 2003 und Qoronfleh, 2006). Denkbar ist, damit neue Proteine zu identifizieren und einen vertiefenden Einblick in die Entstehung des neuropathischen Schmerzes zu gewinnen.

Wie von *Niederberger et al.* in einer Übersichtsarbeit berichtet wurde, sind inzwischen an mehreren neuropathischen Tiermodellen bereits solche Proteom-Analysen veröffentlicht worden. Eine Vielzahl von Proteinregulationen konnten

dabei auch an Spinalganglien nach neuropathischen Schmerzmodellen festgestellt werden. Die Mehrzahl der gefundenen Änderungen in der Proteinexpression sind Proteine, die eine Rolle im Zellstoffwechsel oder der Zellstruktur spielen (Niederberger, Geisslinger, 2008). Die exakten Mechanismen, die neuropathischen Schmerz auslösen, sind trotz dieser Untersuchungen weiterhin unklar. Besonders Modifikationen auf Proteinebene könnten aber entscheidende Hinweise für das Verständnis dieser Mechanismen geben (Scholz, Woolf, 2002).

Eine weitere Problematik stellt die Reproduzierbarkeit der Experimente dar und die unterschiedlichen Standards der einzelnen Laboratorien. Es wird daher ein standardisiertes Netzwerk von Laboratorien gefordert, die mit den gleichen Protokollen und Standards arbeiten (Qoronfleh, 2006 und Niederberger, Geisslinger, 2008). Grundlegende Standards für eine Veröffentlichung in Proteomik-Journals sind bereits festgelegt worden (Wilkins et al., 2006), einheitliche Protokolle für die Proteomik an neuropathischen Schmerzmodellen wurden jedoch bislang nicht veröffentlicht. Ein Netzwerk zwischen diesen Laboratorien, wie es vergleichbar bereits für das Zentralnervensystem als „Human Brain Proteom Project“ existiert (Hamacher et al., 2008), könnte daher entscheidende Fortschritte bringen und die Ätiologie des neuropathischen Schmerzes weiter aufklären.

6. Zusammenfassung

Die experimentelle pharmakologische Wirkstoff-Forschung ist auf neue biomedizinische Techniken angewiesen, um innovative Medikamente zu entwickeln. Im Bereich der Schmerzpharmakologie haben die zurzeit genutzten Wirkstoffe bei guter Wirkung häufig auch eine hohe Nebenwirkungsrate. Um neue und gezieltere Angriffspunkte für Medikamente zu identifizieren, ist ein genaueres Verständnis der Pathophysiologie des Schmerzes unerlässlich. In dieser Arbeit sollten neue Einblicke in molekularbiologische Veränderungen auf Proteinebene gewonnen werden, die im Gewebe durch neuropathischen Schmerz ausgelöst werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein bereits beschriebenes „Tibial Nerve Injury (TNI)“-Modell an der Ratte im Labor etabliert. An diesen Tieren wurde die Entstehung neuropathischer Schmerzen nach operativer Nervschädigung im Sinne einer mechanischen Allodynie durch den von Frey-Test und im Sinne einer thermischen Hyperalgesie durch den Plantartest nachgewiesen. Anschließend wurde die komplette Methodik von der Probenaufbereitung bis zur optimalen 2D-Gelelektrophorese etabliert, um das durch den neuropathischen Schmerz veränderte Proteom der Spinalganglien des Nervus Ischiadicus der Ratte darzustellen. Vor- und Nachteile verschiedener Teilmethoden wurden dabei ausführlich dargestellt und diskutiert. Beispielhaft wurden differentiell exprimierte Proteinspots am Spinalganglion L4 und L6 gezeigt. Sämtliche Proteingele stehen nun für die weitergehende massenspektrometrische Analyse zur Verfügung. Die Identifikation neuer Proteine, deren Expression nach Auslösung neuropathischer Schmerzen im Gewebe erhöht ist, könnte langfristig zur Entwicklung innovativer und gezielterer Schmerzmedikamente führen.

7. Literaturverzeichnis

1. Aebersold, R., Mann, M. (2003):
Mass spectrometry-based proteomics.
Nature 422, 198-207.
2. Aiping, L., Wisniewski J.R., Mann, M. (2009):
Comparative Proteomic Profiling of Membrane Proteins in Rat Cerebellum,
Spinal Cord, and Sciatic Nerve.
J. Proteome Res. 8, 2418-2425
3. Alzate, O., Hussain, S. R., Goettl, V. M., Tewari, A. K., Madiat, F., Stephens,
R. L., Jr., Hackshaw, K. V. (2004):
Proteomic identification of brainstem cytosolic proteins in a neuropathic pain
model.
Mol. Brain. Res. 128, 193-200.
4. Baron, R. (2006):
Diagnostik und Therapie neuropathischer Schmerzen.
Dtsch. Arztebl. 103, 2720-2730.
5. Bennett, A. D., Chastain, K. M., Hulsebosch, C. E. (2000):
Alleviation of mechanical and thermal allodynia by CGRP (8-37) in a rodent
model of chronic central pain.
Pain 86, 163-175.
6. Bennett, G.J., Xie, Y.K. (1988):
A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation
like those seen in man.
Pain 33, 87-107.

7. Berkelmann, T. S., Westermeier, R. (1998):
2-D Electrophoresis. Principles and Methods.
GE Healthcare Handbooks.
8. Brain, S.D., Moore, P.K. (1999):
Pain and Neurogenic Inflammation.
Basel: Birkhäuser Verlag.
9. Campbell, J.N., Meyer, R.A. (2006):
Mechanisms of neuropathic pain.
Neuron 52, 77-92.
10. Cavenagh, J., Good, P., Ravenscroft, P. (2006):
Neuropathic pain: are we out of the woods yet?
Intern Med. J. 36, 251-255.
11. Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L. (1994):
Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw.
J Neurosci. Methods 53, 55-63.
12. Chen, H., Lamer, T.J., Rho, R.H., Marshall, K.A., Sitzman, B.T., Ghazi, S.M.,
Brewer, R.P. (2004):
Contemporary management of neuropathic pain for the primary care physician.
Mayo Clin. Proc. 79, 1533-1545.
13. Choudhary, J., Grant, S. G. (2004):
Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning.
Nat. Neurosci. 7, 440-445.

14. Costigan, M., Befort, K., Karchewski, L., Griffin, R. S., D'Urso, D., Allchorne, A., Sitariski, J., Mannion, J. W., Pratt, R. E., Woolf, C. J. (2002):

Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury.

BMC Neurosci. 3, 16.

15. Cox, J. J., Reimann, F., Nicholas, A. K., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K., Karbani, G., Jafri, H., Mannan, J., Raashid, Y., Al-Gazali, L., Hamamy, H., Valente, E. M., Gorman, S., Williams, R., McHale, D. P., Wood, J. N., Gribble, F. M., Woods, C. G. (2006):

An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain.

Nature 444, 894-898.

16. Decosterd, I., Woolf, C.J. (2000):

Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain.

Pain 87, 149-158.

17. Deetjen, P., Speckmann, E.-J., Hescheler, J. (2006):

Physiologie. München:

Urban und Fischer Verlag bei Elsevier.

18. Dreser, H. (1899):

Pharmakologisches über Aspirin (Acetylsalicylsäure).

Pflügers Arch. 76, 306-318

19. Erichsen, H. K., Blackburn-Munro, G. (2002):

Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain.

Pain 98, 151-161.

20. Fukuoka, T., Tokunaga, A., Kondo, E., Miki, K., Tachibana, T., Noguchi, K. (1998):
Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA(A) receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model.
Pain 78, 13-26.
21. Görg, A., Postel, W., Günther, S. (1988):
The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.
Electrophoresis 9, 531-546.
22. Görg, A., Postel, W., Günther, S., Weser, J. (1985):
Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension.
Electrophoresis 6, 599-604.
23. Görg, A., Weiss, W., Dunn, M. J. (2004):
Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics.
Proteomics 4, 3665-3685.
24. Guindon, J., Hohmann, A. G. (2008):
Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain.
Br. J. Pharmacol. 153, 319-34.
25. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., Aebersold, R. (1999):
Correlation between protein and mRNA abundance in yeast.
Mol. Cell. Biol. 19, 1720-1730.
26. Hamacher, M., Stephan, C., Eisenacher, M., Hardt, T., Marcus, K., Meyer, H. E., Tribl, F., Wiltfang, J., Martens, L., Desiderio, D., Gutstein, H., Park, Y. M., Henkel, A., Jimenez, C. R., van Hall, A., Klose, J., Grunewald, P., Rammert,

K., Bustamante, N. P., Lewczuk, P., Vizcaino, J. A., Kwon, K. H., Yoo, J. S., Beckers, J., Gutstein, H. B., Herberg, F., Arnold, G., Becker, A., Bluggel, M., Carrette, O., Colvis, C., Dunn, M. J., Frohlich, T., Fountoulakis, M., Ji, J., Kretzschmar, H., Lubec, G., Palacios Bustamante, N., Pennington, S. R., Reidegeld, K. A., Riederer, P., Rossier, J., Sanchez, J. C., Schrader, M., Tagle, D., Thiele, H., Wang, J., Zhang, C., Taylor, C., Jones, P., Muller, M., Korting, G., Chamrad, D. C., Parkinson, D., Binz, P. A., Lyall, A., Pfeiffer, K., Joppich, C., Jung, K., Schmidt, O., Urfer, W., Gantly, A., Chamrad, D., Hermjakob, H., Dowsey, A., and Reidegeld, K. (2008):

Maintaining standardization: an update of the HUPO Brain Proteome Project. *Expert Rev. Proteomics* 5, 165-173.

27. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J. (1988):
A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia.
Pain 32, 77-88.

28. Heukeshoven, J., Dernick, R. (1985):
Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining.
Electrophoresis 6, 103-112.

29. Hofmann, H. A., De Vry, J., Siegling, A., Spreyer, P., Denzer, D. (2003):
Pharmacological sensitivity and gene expression analysis of the tibial nerve injury model of neuropathic pain.
Eur. J. Pharmacol. 470, 17-25.

30. Hofmann, H.A., Denzer, D., Boeß, F.G., Siegling, A. (2000):
Altered gene expression in a new rat model of neuropathic pain.
Soc. Neurosci. Abstr. 26, 1214.

31. Honore, P., Rogers, S. D., Schwei, M. J., Salak-Johnson, J. L., Luger, N. M., Sabino, M. C., Clohisy, D. R., Mantyh, P. W. (2000):
Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons.
Neuroscience 98, 585-598.
32. Huang, H. L., Cendan, C. M., Roza, C., Okuse, K., Cramer, R., Timms, J. F., Wood, J. N. (2008):
Proteomic profiling of neuromas reveals alterations in protein composition and local protein synthesis in hyper-excitable nerves.
Mol. Pain 4, 33.
33. Huber, L. A. (2003):
Is proteomics heading in the wrong direction?
Mol. Cell. Biol. 4, 74-80.
34. Ingelmo, P.M., Fumagalli, R.(2004):
Neuropathic pain in children.
Minerva Anesthesiol. 70, 393-398.
35. Ji, R.R., Suter, M.R. (2007):
p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain.
Mol. Pain 3, 33.
36. Jimenez, C. R., Stam, F. J., Li, K. W., Gouwenberg, Y., Hornshaw, M. P., De Winter, F., Verhaagen, J., Smit, A. B. (2005):
Proteomics of the injured rat sciatic nerve reveals protein expression dynamics during regeneration.
Mol. Cell. Proteomics 4, 120-32.
37. Jungblut, P. R., Zimny-Arndt, U., Zeindl-Eberhart, E., Stulik, J., Koupilova, K., Pleissner, K. P., Otto, A., Muller, E. C., Sokolowska-Kohler, W., Grabher, G., Stoffler, G. (1999):

- Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases.
Electrophoresis 20, 2100-2110.
38. Kahn, P. (1995):
From genome to proteome: looking at a cell's proteins.
Science 270, 369-370.
39. Katano, T., Mabuchi, T., Okuda-Ashitaka, E., Inagaki, N., Kinumi, T., Ito, S. (2006):
Proteomic identification of a novel isoform of collapsin response mediator protein-2 in spinal nerves peripheral to dorsal root ganglia.
Proteomics 6, 6085-6094.
40. Kim, S.H., Chung, J.M. (1992):
An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat.
Pain 50, 355-363.
41. Kingery, W. S. (1997):
A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes.
Pain 73, 123-139.
42. Klose, J. (1975):
Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.
Humangenetik 26, 231-243.
43. Klose, J., Kobalz, U. (1995):
Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome.
Electrophoresis 16, 1034-1059.

44. Komori, N., Takemori, N., Kim, H. K., Singh, A., Hwang, S. H., Foreman, R. D., Chung, K., Chung, J. M., Matsumoto, H. (2007):
Proteomics study of neuropathic and nonneuropathic dorsal root ganglia:
altered protein regulation following segmental spinal nerve ligation injury.
Physiol. Genomics 29, 215-230.
45. Laemmli, U. K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.
46. Lee, B.H., Won, R., Baik, E.J., Lee, S.H., Moon, C.H. (2000)
An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve
branches.
Neuroreport 11, 657-661.
47. Lee, S. C., Yoon, T. G., Yoo, Y. I., Bang, Y. J., Kim, H. Y., Jeoung, D. I., Kim,
H. J. (2003):
Analysis of spinal cord proteome in the rats with mechanical allodynia after the
spinal nerve injury.
Biotechnol. Lett. 25, 2071-2078.
48. Lenstra, J. A., Bloemendal, H. (1983):
Topography of the total protein population from cultured cells upon
fractionation by chemical extractions.
Eur. J. Biochem 135, 413-423.
49. Mattick, J.S. (2003):
The human genome and the future of medicine.
Med. J. Aust. 179, 212-216.

50. Merrill, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A., Ebert, M. H. (1981):
Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins.
Science 211, 1437-1438.
51. Merskey, H., Bogduk, N. (1994):
Classification of Pain: 2. Ed.
Seattle: IASP Press.
52. Miller, I., Crawford, J., Gianazza, E. (2006):
Protein stains for proteomic applications: which, when, why?
Proteomics 6, 5385-5408.
53. Montagne-Clavel, J., Oliveras, J. L. (1996):
The "plantar test" apparatus (Ugo Basile Biological Apparatus), a controlled infrared noxious radiant heat stimulus for precise withdrawal latency measurement in the rat, as a tool for humans?
Somatosens. Mot. Res. 13, 215-223.
54. Moss, A., Ingram, R., Koch, S., Theodorou, A., Low, L., Baccei, M., Hathway, G., Costigan, M., Salton, S. R., Fitzgerald, M. (2008):
Origins, actions and dynamic expression patterns of the neuropeptide VGF in rat peripheral and central sensory neurones following peripheral nerve injury.
Mol. Pain 4, 62.
55. Nahin, R. L., Ren, K., De Leon, M., Ruda, M. (1994):
Primary sensory neurons exhibit altered gene expression in a rat model of neuropathic pain.
Pain 58, 95-108.

56. Nesterenko, M. V., Tilley, M., Upton, S. J. (1994):
A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* 28, 239-242.
57. Neuhoﬀ, V., Stamm, R., Eibl, H. (1985):
Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis.
Electrophoresis 6, 427-448.
58. Niederberger, E., Geisslinger, G. (2008):
Proteomics in neuropathic pain research.
Anesthesiology 108, 314-323.
59. O'Farrell, P. H. (1975):
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.
J. Biol. Chem. 250, 4007-21.
60. Ong, S.-E., Foster, L.J., Mann, M.(2003):
Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics.
Methods 29, 124-130
61. Orth, A. P., Batalov, S., Perrone, M., Chanda, S. K. (2004):
The promise of genomics to identify novel therapeutic targets.
Expert Opin. Ther. Targets 8, 587-596.
62. Pertin, M., Allchorne, A. J., Beggah, A. T., Woolf, C. J., Decosterd, I. (2007):
Delayed sympathetic dependence in the spared nerve injury (SNI) model of neuropathic pain.
Mol. Pain 3, 21.

63. Polgar, E., Todd, A. J. (2008):
Tactile allodynia can occur in the spared nerve injury model in the rat without selective loss of GABA or GABA(A) receptors from synapses in laminae I-II of the ipsilateral spinal dorsal horn.
Neuroscience 156, 193-202.
64. Pschyrembel, W. (2007):
Klinisches Wörterbuch. 261. Auflage.
Berlin: Walter de Gruyter Verlag.
65. Qoronfleh, M. W. (2006):
Role and challenges of proteomics in pharma and biotech: technical, scientific and commercial perspective.
Expert Rev. Proteomics 3, 179-195.
66. Raymer, D. M., Smith, D. E. (2007):
A simple system for staining protein and nucleic acid electrophoresis gels.
Electrophoresis 28, 746-748.
67. Roth-Isigkeit, A. (2006).
Zur Epidemiologie von anhaltenden und/oder wiederkehrenden Schmerzen bei Kindern.
Monatsschr. Kinderheilkd. 154, 741-754.
68. Sander, K., Kottke, T., Stark, H. (2008):
Histamine H3 receptor antagonists go to clinics.
Biol. Pharm. Bull. 31, 2163-2181.
69. Scholz, J., Woolf, C.J. (2002):
Can we conquer pain?
Nat. Neurosci. 5 Suppl, 1062-1067.

70. Seltzer, Z., Dubner, R., Shir, Y. (1990):
A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury.
Pain 43, 205-218.
71. Shaw, J., Rowlinson, R., Nickson, J., Stone, T., Sweet, A., Williams, K., Tonge, R. (2003):
Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes.
Proteomics 3, 1181-1195.
72. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996):
Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels.
Anal. Chem. 68, 850-858.
73. Siegling, A., Hofmann, H. A., Denzer, D., Mauler, F., De Vry, J. (2001):
Cannabinoid CB(1) receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain.
Eur. J. Pharmacol. 415, 5-7.
74. Sitek, B., Potthoff, S., Schulenburg, T., Stegbauer, J., Vinke, T., Rump, L. C., Meyer, H. E., Vonend, O., Stuhler, K. (2006):
Novel approaches to analyse glomerular proteins from smallest scale murine and human samples using DIGE saturation labeling.
Proteomics 6, 4337-4345.
75. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985):
Measurement of protein using bicinchoninic acid.
Anal. Biochem. 150, 76-85.

76. Starowicz, K., Przewlocki, R., Gispen, W.H., Przewlocka, B. (2002):
Modulation of melanocortin-induced changes in spinal nociception by mu-opioid receptor agonist and antagonist in neuropathic rats.
Neuroreport 13, 2447-2452.
77. Swamydas, M., Skoff, A.M., Adler, J.E. (2004):
Partial sciatic nerve transection causes redistribution of pain-related peptides and lowers withdrawal threshold.
Exp. Neurol. 188, 444-451.
78. Timms, J. F., Cramer, R. (2008):
Difference gel electrophoresis.
Proteomics 8, 4886-4897.
79. Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I., Davison, M. (2001):
Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology.
Proteomics 1, 377-396.
80. Vane, J.R. (1971):
Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.
Nat. New Biol. 231, 232-235.
81. von Mering, C., Krause, R., Snel, B., Cornell, M., Oliver, S. G., Fields, S., Bork, P. (2002):
Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions.
Nature 417, 399-403.

82. Wang, H., Sun, H., Della Penna, K., Benz, R. J., Xu, J., Gerhold, D. L., Holder, D. J., Koblan, K. S. (2002):
Chronic neuropathic pain is accompanied by global changes in gene expression and shares pathobiology with neurodegenerative diseases.
Neuroscience 114, 529-546.
83. Wang, L.X., Wang, Z.J. (2003):
Animal and cellular models of chronic pain.
Adv. Drug. Deliv. Rev. 55, 949-965
84. Weissmann, G. (1991):
Aspirin.
Sci. Am. 264, 84-90.
85. Westermeier, R. (2006):
Sensitive, quantitative, and fast modifications for coomassie blue staining of polyacrylamide gels.
Proteomics 6 Suppl. 2, 61-64.
86. Wilkins, M. R., Appel, R. D., Van Eyk, J. E., Chung, M. C., Gorg, A., Hecker, M., Huber, L. A., Langen, H., Patterson, S. D., Pennington, S. R., Rabilloud, T., Simpson, R. J., Weiss, W., Dunn, M. J. (2006):
Guidelines for the next 10 years of proteomics.
Proteomics 6, 4-8
87. Woolf, C.J., Mannion, R.J. (1999):
Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management.
Lancet 353, 1959-1964.

88. Yan, J. X., Harry, R. A., Spibey, C., Dunn, M. J. (2000):
Postelectrophoretic staining of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using SYPRO dyes.
Electrophoresis 21, 3657-3665.
89. Zimmermann, M. (1983):
Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.
Pain 16, 109-110.

8. Anhang

8.1. Abkürzungen

2D	Zweidimensional
BCA	Bicinchinonsäure
CB1/CB2-Rezeptor	Cannabinoid-Rezeptoren
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
DIGE	Difference Gel Electrophoresis
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DRG	Spinalganglien (engl. Dorsal Root Ganglia)
g	Gramm
h	Stunde
ICAT	Isotope coded affinity tag
mA	Milliampere
MALDI-ToF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption / Time of Flight
mg	Milligramm
min	Minuten
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	Wasserstoff-Ionenkonzentration
pI	Isoelektrischer Punkt

PMF	Peptidmassenfingerprint
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunden
SILAC	Stable isotope labeling with amino acids in cell culture
SNI-Modell	„Spinal Nerve Injury“ -Modell
TNI – Modell	„Tibial Nerve Injury“ - Modell
V	Volt
VIP	Vasointestinales Peptid
W	Watt
µg	Mikrogramm

9. Danksagung

Diese Arbeit wurde mit großzügiger Unterstützung der Bayer Healthcare AG in den Laboren des Instituts für ZNS-Forschung im Bayer-Pharmaforschungszentrum Wuppertal erstellt.

Für die Betreuung meiner Arbeit danke ich vielmals Frau Universitätsprofessorin Dr. med. Angelika Eggert, die zahlreiche Anregungen zur Zusammenstellung der Ergebnisse der Arbeit gab und eine sorgfältige Korrektur des Manuskripts durchführte und eine exzellente Mentorin ist.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Dr. rer. nat. Dirk Denzer, Laborleiter in der ehemaligen ZNS – Forschung im Bayer-Pharmaforschungszentrum für die intensive Unterstützung der Arbeit insbesondere während der Labortätigkeiten und für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite und ist ein großartiger Motivator. Ein ebensolcher Dank gilt Herrn Dietmar Borgmann, Herrn Frank Jüngerkes, Herrn Jörg Freymann, Frau Inga Kruse und Frau Bettina Tretter, die mich bei der Durchführung der Versuche beraten und unterstützt haben.

Meinen Eltern gilt ein ganz besonderer Dank: durch ihre Hilfe wurde mir das Studium der Medizin und auch die Durchführung der Dissertation ermöglicht. Insbesondere mein Vater entfachte schon in meiner Kindheit das Interesse an den Naturwissenschaften und gab entscheidende Anregungen bei der Entstehung dieser Arbeit.

10. Lebenslauf